

**Electroforesis Capilar, Purificación y Derivatización
Fluorescente para el Análisis de Isoformas del Antígeno
Específico de Próstata**

Tesis Doctoral



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental



Instituto de Química Orgánica General

Departamento de Análisis Instrumental y Química Ambiental

Memoria que para optar al grado de Doctor en Ciencias presenta:

Raúl Garrido Medina

Trabajo dirigido por:

Dra. Mercedes de Frutos Gómez

Dr. José Carlos Díez-Masa

Tutelado por:

Dra. María Teresa Sevilla Escribano

Madrid, 2014



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL

D^a. MERCEDES DE FRUTOS GÓMEZ, DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS, INVESTIGADORA CIENTÍFICA DE LA AGENCIA ESTATAL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS,

Y

D. JOSÉ CARLOS DÍEZ-MASA, DOCTOR EN CIENCIAS (SECCIÓN QUÍMICAS), PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DE LA AGENCIA ESTATAL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS,

CERTIFICAN:

Que el trabajo descrito en la presente Memoria, titulado **“Electroforesis capilar, purificación y derivatización fluorescente para el análisis de isoformas del antígeno específico de próstata”** ha sido realizado bajo su dirección por **Raúl Garrido Medina** en el Departamento de Análisis Instrumental y Química Ambiental del Instituto de Química Orgánica General del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Así mismo, manifiestan que el trabajo descrito en la presente Memoria reúne, en su opinión, todos los requisitos para su defensa, por lo que autorizan su presentación para que sea defendido como **Tesis Doctoral**.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente documento a dos de septiembre de dos mil catorce.

Fdo. Dra. D^a. Mercedes de Frutos Gómez

Fdo. Dr. D. José Carlos Díez-Masa

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores de Tesis, el Dr. José Carlos Díez-Masa y la Dra. Mercedes de Frutos Gómez, la posibilidad de realizar este trabajo de Tesis Doctoral, y el apoyo y conocimiento que me han aportado a lo largo de estos años.

Quisiera agradecer también a la Dra. María Teresa Sevilla Escribano, la tutela de este trabajo desde el Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental en la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

A los Drs. Bernardo Herradón y Eduardo García-Junceda, por haber autorizado mi estancia en el Instituto de Química Orgánica General del CSIC como directores de dicho Instituto.

Quisiera hacer extensivo mi agradecimiento a todo el personal del Instituto de Química Orgánica General, por su ayuda en muchos aspectos del desarrollo de este trabajo.

Desearía expresar mi especial agradecimiento al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una beca para la Formación de Profesorado Universitario (FPU), sin la cual no hubiera sido posible la realización de esta Tesis Doctoral.

Mi gratitud también al Ministerio de Educación y Ciencia por la posibilidad de participar en los proyectos de investigación CTQ2006-05214/BQU y HH2006-0013, al Ministerio de Ciencia e Innovación por el proyecto de investigación CTQ2009-09399/BQU y al Ministerio de Economía y Competitividad por el proyecto de investigación CTQ2013-43236-R.

Me gustaría también expresar mi gratitud hacia la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines (SECyTA), por las ayudas concedidas para la asistencia a Congresos y Reuniones Científicas.

*Electroforesis Capilar, Purificación y Derivatización
Fluorescente para el Análisis de Isoformas del Antígeno
Específico de Próstata*

ÍNDICE GENERAL

<i>Abreviaturas y Acrónimos</i>	<i>5</i>
<i>Resumen y Estructura de la Memoria</i>	<i>13</i>
<i>Introducción General</i>	<i>23</i>
<i>Objetivos y Plan de Trabajo</i>	<i>95</i>
<i>Capítulo 1. Métodos de electroforesis capilar para el análisis de isoformas del antígeno específico de próstata</i>	<i>101</i>
<i>Capítulo 2. Cromatografía de inmunoafinidad para la purificación de PSA a partir de muestras biológicas y análisis de sus isoformas por electroforesis capilar</i>	<i>157</i>
<i>Capítulo 3. Derivatización fluorescente de glicoproteínas para el análisis de sus isoformas por electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser</i>	<i>203</i>
<i>Conclusiones Generales</i>	<i>279</i>

*Abreviaturas y
Acrónimos*

$\%A_{\text{corr}}$	Porcentaje de área corregida
$\Delta\mu$	Diferencia entre movilidades electroforéticas
ϵ_0	Constante dieléctrica en el vacío
ϵ	Coeficiente de extinción molar
ϵ_r	Constante dieléctrica relativa del tampón de separación
$\bar{\mu}$	Valor medio de las movilidades electroforéticas aparentes
μ_{ap}	Movilidad electroforética aparente
μ_{ef}	Movilidad electroforética
μ_{EOF}	Movilidad del flujo electroosmótico
η	Viscosidad del medio
σ	Desviación estándar en unidades de longitud de pico electroforético
ζ	Potencial zeta de la superficie
2D-GE	Electroforesis bidimensional en gel
5-IAF	5-Iodoacetamida fluoresceína
6-AQC	6-Aminoquinolil-N-hidroxi-succinimidil carbamato
6-IAF	6-Iodoacetamida fluoresceína
A	Absorbancia espectroscópica
Ab	Anticuerpo
ACE	Electroforesis capilar de afinidad
ACT	α -1-Antiquimotripsina
Ag	Antígeno
AGP	α 1-Glicoproteína ácida
APD	Fotodiodos de avalancha

Asn-45	Asparagina-45
b	Camino óptico
BGE	Tampón de separación o electrolito de fondo
BODIPY-IA	BODIPY® FL C ₁ -IA, N-((4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-boro-3a,4a-diazo-s-indaceno-3-il)metil) iodoacetamida
BPH	Hiperplasia benigna de próstata
bPSA	PSA benigno
Brij®35	Polioxietileno 23 lauril éter
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Concentración de analito
CCD	<i>Charge-coupled devices</i>
CE	Electroforesis capilar
CEC	Electrocromatografía capilar
CGE	Electroforesis capilar en gel
CIEF	Isoelectroenfoque capilar
CITP	Isotacoforesis capilar
cmc	Concentración micelar crítica
C _p	Concentración de fluoróforo en el BGE
CSE	Electroforesis capilar por tamizado molecular
CZE	Electroforesis capilar en zona libre
D	Coeficiente de difusión
DPSS	<i>Diode-pumped solid state</i>
DR	Reserva dinámica
DTT	Ditiotreitol

E	Intensidad del campo eléctrico aplicado al medio de separación
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción con enzimas
EMMA	Microanálisis controlado electroforéticamente
EOF	Flujo electroosmótico
EPO	Eritropoyetina
EPS	Fluidos de secreción expresada en la próstata
fPSA	PSA libre
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , Agencia de Alimentación y Medicamentos de Estados Unidos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FQ	3-(2-furoil)quinolin-2-carboxialdehído
HIC	Cromatografía de interacción hidrófoba
HILIC	Cromatografía de líquidos de interacción hidrófila
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HSA	Seroalbúmina humana
IAC	Cromatografía de inmunoafinidad
id	Diámetro interno
IEC	Cromatografía de intercambio iónico
IEF	Isoelectroenfoque
IMAC	Cromatografía de afinidad con iones metálicos
IPG	Gradiente de pH inmovilizados
l	Longitud efectiva de separación del capilar
L	Longitud total del capilar

LC	Cromatografía de líquidos
LED	<i>Light-Emitting Diodes</i>
LIF	Fluorescencia inducida por láser
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MC 540	Merocianina 540
MEKC	Cromatografía electrocinética micelar
MHEC	Metil-(hidroxietil) celulosa
MM	Marcadores de peso molecular
MS	Espectrometría de masas
N	Número de platos teóricos
NCI	<i>National Cancer Institute</i> , Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos
NDA	2,3-naftalenodicarboxialdehído
Nd-YAG	<i>Neodymium- Yttrium Aluminium Garnet</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i> , Institutos Nacionales de la Salud de Estados Unidos
NIR	Infrarrojo cercano
od	Diámetro externo
OPA	Orto-ftalaldehído
P503	Chromeo™ P503
PAP	Fosfatasa ácida de próstata
PBS	Tampón fosfato salino
PEEK	Poliéter éter cetona

PEO	Óxido de polietileno
pI	Punto isoeléctrico
PMT	Tubo fotomultiplicador
PNGasa F	Péptido-N-glicosidasa F
PSA	Antígeno específico de próstata
PSMA	Antígeno de membrana específico de próstata
PTMs	Modificaciones post-traducción
q	Carga eléctrica de la molécula
r	Radio hidrodinámico de la molécula
R	Porcentaje de recuperación
RibB	Ribonucleasa B
R _s	Resolución entre picos electroforéticos
RSD	Desviación estándar relativa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida mediada por SDS
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
S/N	Relación señal/ruido
SPE	Extracción en fase sólida
SPS	Pentilsulfato sódico
TCEP	Tris(2-carboxietil) fosfina
Tf	Transferrina
t _m	Tiempo de migración
tPSA	PSA total
TR	Ratio de transferencia

Tris	Tris(hidroxietyl) aminometano
UV-Vis	Ultravioleta/visible
V	Diferencia de potencial
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
V_{EOF}	Velocidad del EOF
V_m	Velocidad de migración
w	Anchura a la base del pico electroforético

*Resumen y Estructura
de la Memoria*

El trabajo presentado en esta Memoria de Tesis Doctoral se centra en el desarrollo de métodos de análisis del antígeno específico de próstata (PSA, acrónimo del término inglés *prostate-specific antigen*). El estudio realizado abarca tres aspectos destacados en la Química Analítica actual referidos al análisis de proteínas de interés clínico, que son: la preparación de muestras biológicas, la separación de biomoléculas con mínimas diferencias estructurales y la detección de bajas concentraciones de proteína. La relevancia de estos aspectos se incrementa cuando el objeto de estudio es una proteína involucrada en la detección y diagnóstico de una enfermedad tan devastadora como es el cáncer. En este caso concreto, el cáncer de próstata supone el tipo de cáncer con mayor incidencia en varones de los países occidentales y con la tercera más importante tasa de mortalidad por esta enfermedad, lo que lo sitúa en el punto de mira de muchos investigadores de diversos campos en todo el mundo. La concentración de la glicoproteína PSA en sangre, es el parámetro que se utiliza actualmente en clínica, junto con la biopsia guiada por ecografía transrectal, para el diagnóstico del cáncer de próstata.

Sin embargo, el empleo de la concentración de PSA como biomarcador de la enfermedad plantea el gran inconveniente, aún hoy en día sin resolver, de la especificidad insuficiente proporcionada por el test. Esta falta de especificidad, además de plantear complicaciones para los pacientes, supone unos gastos médicos muy elevados. Por esta razón, a lo largo de los últimos años se han propuesto algunos biomarcadores alternativos. En este sentido, algunos trabajos recientes, revelan evidencias de una glicosilación del PSA alterada en células tumorales presentes en la glándula prostática, lo que incentiva la realización de diversos estudios sobre comparación de la glicosilación del PSA en individuos sanos y en pacientes, bien con enfermedades prostáticas no malignas o con cáncer en diversos estadios.

Las diferencias en la longitud de la cadena peptídica de PSA o en su glicosilación dan lugar a diferentes formas moleculares de la glicoproteína. Las

técnicas de separación permiten separar isoformas de una glicoproteína, cada una de las cuales incluye generalmente varias formas. Por ello, es de interés el poder realizar estudios para comprobar si el perfil de isoformas de PSA es diferente en individuos sanos y en individuos con enfermedades no malignas de próstata y con cáncer de próstata. Para poder llevar a cabo este estudio comparativo es necesario desarrollar previamente métodos que permitan purificar PSA a partir de fluidos biológicos, separar isoformas de PSA y detectar las isoformas existentes en bajas concentraciones.

El trabajo presentado en esta Memoria de Tesis Doctoral aborda el desarrollo de estos métodos de purificación, separación y detección, empleando la electroforesis capilar (CE) como técnica para el análisis de isoformas del PSA. El análisis por electroforesis capilar se combina con la cromatografía de inmunoadfinidad, una técnica altamente selectiva de purificación de proteínas empleada en la etapa de preparación de muestra. El objetivo general de este trabajo de investigación es obtener una metodología analítica completa (preparación de muestra, separación de isoformas y detección sensible de éstas) que en un futuro permita diferenciar muestras de PSA procedentes de individuos sanos, pacientes con enfermedades no malignas de próstata y enfermos con cáncer de próstata.

El trabajo desarrollado se ha estructurado en tres Capítulos y la presentación de la Memoria se ha dividido en las partes que se describen a continuación.

En primer lugar, se presentan los Objetivos y el Plan de Trabajo del estudio realizado.

A continuación, la Introducción General describe a grandes rasgos los aspectos fundamentales de los temas que son objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral: el cáncer de próstata, centrándose en la problemática actual acerca de su diagnóstico y el importante papel que desempeña el antígeno específico de próstata;

la electroforesis capilar, describiendo antecedentes históricos, situación actual, aplicación al análisis de proteínas y fundamentalmente los métodos de detección que se aplican, con especial dedicación a la detección fluorescente; y por último, la purificación de proteínas presentes en matrices biológicas para su análisis por electroforesis capilar, recogiendo los métodos más empleados y haciendo una mención especial a la cromatografía de inmunofinidad.

Cada uno de los capítulos está escrito con estructura de publicación, aunque incluyendo más detalles que los que se pueden encontrar en cada uno de los correspondientes trabajos publicados. Con esta estructura, se ha tratado de que cada capítulo pueda entenderse por sí mismo, de manera independiente del resto de la Tesis. Ello conlleva que a lo largo de la Memoria se repitan en los distintos capítulos algunas ideas generales, aspectos experimentales y citas bibliográficas.

En el Capítulo 1 se describe el desarrollo y optimización de diversos métodos de electroforesis capilar en zona libre para la separación de isoformas del antígeno específico de próstata. Los diferentes métodos fueron desarrollados en base a diferentes recubrimientos de la pared interna del capilar empleados en esta técnica para, fundamentalmente, evitar la adsorción de las proteínas a dicha pared. Además, los recubrimientos usados se seleccionaron bajo el criterio de que no poseyeran grupos amino primarios en su estructura. Este criterio se impuso debido a que, posteriormente, se pretendía aplicar estos mismos métodos para el análisis por CE con detección por fluorescencia inducida por láser del PSA tras su derivatización fluorescente en la columna de separación, estando entre los reactivos derivatizantes a considerar los que reaccionan a través de los grupos amino primarios de las proteínas. En este estudio se consiguió la separación de isoformas del antígeno específico de próstata por electroforesis capilar en zona libre empleando sustancias que recubren la pared interna del capilar satisfactoriamente, tales como la amina secundaria cíclica morfina, los polímeros metil-(hidroxietil) celulosa y óxido de

polietileno, la sal de amonio cuaternario bromuro de decametonio y las soluciones poliméricas comerciales EOTrol® y UltraTrol®. Los métodos, empleando los diferentes recubrimientos, fueron optimizados variando parámetros de separación tales como longitud del capilar, voltaje de separación o pH y concentración del tampón de separación. Como criterios de optimización se consideraron la resolución de las distintas isoformas, el tiempo de separación y la repetibilidad de los parámetros tiempo de migración y porcentaje de área corregida. El recubrimiento con bromuro de decametonio, proporcionó la mayor resolución, mientras que morfolina y UltraTrol® permitieron disminuir el tiempo de análisis.

En el Capítulo 2 se presenta el desarrollo de un método de cromatografía de inmunoafinidad aplicado a la purificación del PSA contenido en plasma seminal. En primer lugar, se fabricó la columna cromatográfica partiendo de un relleno de sílice funcionalizada con grupos epóxido, al que se unió el anticuerpo anti-PSA, empleando un método previamente desarrollado en el laboratorio. Una vez empaquetada la columna, se procedió, empleando PSA estándar, a optimizar el método de captura y recuperación de esta glicoproteína. Se ensayaron diferentes agentes de elución tales como tampones ácidos, sustancias caotrópicas, soluciones con elevada fuerza iónica o tampones alcalinos. Durante el desarrollo del método se observó que algunos de los agentes de desorción, aunque proporcionaban una buena recuperación de la glicoproteína, no permitían posteriormente la separación por electroforesis capilar de las isoformas del PSA de una forma adecuada, probablemente debido a su desnaturalización. Otros, sin embargo, proporcionaban una baja o nula recuperación. El resultado más satisfactorio se alcanzó utilizando como agente de elución una solución de ácido propiónico 1 M que, empleando PSA estándar, proporcionó la extracción de la glicoproteína de la columna de inmunoafinidad con una recuperación aceptable y que permitió a su vez el posterior análisis de isoformas por electroforesis capilar con una buena repetibilidad. Posteriormente, el método se aplicó a una muestra de plasma seminal de un

individuo sano, obteniéndose también para esta muestra la separación por electroforesis capilar de las distintas isoformas del PSA con una buena resolución y repetibilidad.

El Capítulo 3 recoge los distintos métodos de derivatización fluorescente que se aplicaron al antígeno específico de próstata para su análisis por electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser. Es bien sabido que una de las limitaciones más importantes de la electroforesis capilar es su limitada sensibilidad cuando se emplea la detección UV-Visible y que la detección fluorescente resuelve este problema para determinadas proteínas. Por otro lado, el procedimiento más general para la detección fluorescente de proteínas es su derivatización con un fluoróforo o una sustancia fluorogénica. Sin embargo, la derivatización de una glicoproteína para la separación posterior de sus isoformas plantea dos grandes problemas. En primer lugar, la reacción de derivatización de las distintas formas moleculares de la glicoproteína podría dar lugar a múltiples derivados para cada una de las formas, lo que complicaría extraordinariamente la detección de las isoformas de la glicoproteína. En segundo lugar, las concentraciones muy bajas a las que se encuentran algunas glicoproteínas como el PSA en algunas matrices biológicas, limitan la cinética de reacción de derivatización, lo que conduce a una reducida sensibilidad. Teniendo en cuenta estos aspectos, se seleccionaron agentes derivatizantes ya descritos en la literatura, que o bien no modifican el punto isoelectrico de la proteína tras el marcado fluorescente, lo que ayuda a reducir el número de picos detectados en el análisis por electroforesis capilar con detección fluorescente, o bien tienen la capacidad de derivatizar proteínas a niveles muy bajos de concentración. El primer método empleado, con resultado insatisfactorio, fue el de derivatización no-covalente. A continuación, se estudió el efecto de la derivatización fluorescente de PSA a través de sus grupos tiol con dos reactivos diferentes de iodoacetamida, derivados de fluoresceína y BODIPY®. Éstos permitieron la detección fluorescente de PSA pero no permitieron la separación de

sus isoformas, al contrario de lo que ocurrió para otra proteína, la $\alpha 1$ -glicoproteína ácida. Finalmente, el PSA se derivatizó con éxito de forma covalente, tanto fuera del capilar de separación como en el interior de éste, a través de sus grupos amino primarios empleando un reactivo derivado de pirilio, denominado Chromeo P503®. Tanto en el procedimiento *off-line* como en el *on-line* se optimizaron diferentes parámetros, obteniéndose para ambos modos perfiles electroforéticos que mostraban la separación de isoformas de la glicoproteína por electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser, salvando así el primer gran obstáculo de la derivatización fluorescente de glicoproteínas para su análisis por electroforesis. La derivatización de la proteína en el interior del capilar permitió reducir el tiempo de reacción de 4 horas a menos de un minuto, aumentando ligeramente la sensibilidad para PSA en concentración μM en comparación con la derivatización fuera del capilar. Hay que tener en cuenta que no se ha intentado en este trabajo derivatizar PSA en el interior del capilar, a concentraciones en la muestra inferiores a la μM .

En la última sección, Conclusiones Generales, se recogen las conclusiones más destacadas a las que se llega a lo largo del trabajo descrito en los capítulos de esta Memoria.

Los estudios que se presentan, de forma detallada, en esta Memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

R. Garrido-Medina, J.C. Diez-Masa, M. de Frutos*

“CE methods for analysis of isoforms of prostate-specific antigen compatible with on-line derivatization for LIF detection”

Electrophoresis 32, 2036-2043 (2011)

R. Garrido-Medina, A. Puerta, Z. Rivera-Monroy, M. de Frutos, A. Guttman, J.C. Diez-Masa*

“Analysis of alpha-1-acid glycoprotein isoforms using CE-LIF with fluorescent thiol-derivatization”

Electrophoresis 33, 1113-1119 (2012)

R. Garrido-Medina, A. Puerta, C. Pelaez-Lorenzo, Z. Rivera-Monroy, A. Guttman, J.C. Diez-Masa, M. de Frutos*

“Capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection of proteins from two types of complex sample matrices: food and biological fluids” en *Capillary Electrophoresis of Biomolecules: Methods and Protocols*. Methods in Molecular Biology Series. N. Volpi y F. Maccari Eds. vol. 984, Springer Protocols, Humana Press, 2013. DOI 10.1007/978-1-62703-296-4_15

R. Garrido-Medina, J.C. Diez-Masa, M. de Frutos*

“On-capillary fluorescent labeling and capillary electrophoresis laser-induced analysis of glycoforms of intact prostate-specific antigen”

Electrophoresis 34, 2295-2302 (2013)

R. Garrido-Medina, N. Farina-Gomez, J.C. Diez-Masa, M. de Frutos*

“Immunoaffinity chromatographic isolation of prostate-specific antigen from seminal plasma for capillary electrophoresis analysis of its isoforms”

Analytica Chimica Acta 820, 47-55 (2014)

Introducción General

ÍNDICE

I.1. CÁNCER DE PRÓSTATA	27
I.1.1. Diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata	28
I.1.1.1. Biomarcadores	28
I.1.1.2. Biomarcadores del cáncer de próstata	30
I.1.2. Antígeno específico de próstata	31
I.1.2.1. El PSA como biomarcador del cáncer de próstata	33
I.2. ELECTROFORESIS CAPILAR	37
I.2.1. Fundamentos de la CE	38
I.2.1.1. El capilar de sílice	38
I.2.1.2. Desplazamiento de las especies químicas en un capilar de sílice bajo la acción de un campo eléctrico	39
I.2.1.3. Parámetros de separación en CE	43
I.2.1.4. Aspectos fundamentales de instrumentación y metodología en CE	45
I.2.2. CE de proteínas	46
I.2.3. Detección de proteínas en CE	50
I.2.3.1. Detección UV-Vis	51
I.2.3.2. Detección LIF	52
I.2.4. Detección fluorescente para el análisis de proteínas por CE	55
I.2.4.1. Modos de derivatización fluorescente en CE-LIF	59
I.2.4.2. Reactivos de derivatización fluorescente de proteínas en CE-LIF	61
I.2.4.2.1. Derivatización covalente	61
I.2.4.2.2. Derivatización no-covalente	64
I.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN MATRICES BIOLÓGICAS PARA SU ANÁLISIS POR CE	66
I.3.1. Métodos cromatográficos para la purificación de proteínas	69
I.3.2. Métodos de purificación de proteínas basados en interacciones de afinidad	71
I.4. REFERENCIAS	81

I.1. CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer es una patología caracterizada por un crecimiento descontrolado de células, denominadas en estas circunstancias células tumorales, que crecen invadiendo tejidos cercanos al tumor y en condiciones más agresivas, pueden migrar alcanzando órganos y tejidos en otras zonas del cuerpo en un estadio del desarrollo tumoral llamado metástasis.

El cáncer es la segunda causa de muerte más importante en incidencia en los países desarrollados, después de las enfermedades cardiovasculares. Además, debido a su creciente incidencia, su diagnóstico, tratamiento y seguimiento ocasionan unos gastos elevadísimos para la medicina clínica. Concretamente, el cáncer de próstata es el tipo más común en varones de países occidentales, con una prevalencia comparable a la del cáncer de mama en mujeres, y supone la tercera causa en incidencia de muerte por cáncer de varones (9,5%) en la Unión Europea, después del cáncer de pulmón (26,1%) y del cáncer colorrectal (11,6%) [1].

La próstata es una glándula exocrina presente en los varones que está situada bajo la vejiga y rodeando la uretra. Esta glándula secreta y almacena un líquido blanquecino, viscoso y ligeramente alcalino que es excretado en la eyaculación formando parte del plasma seminal, del que constituye el 15-30%. La próstata está compuesta por varios alveolos de células epiteliales, unidos por tejido conjuntivo. Anatómicamente, se divide en tres áreas: periférica, central y zonas de transición. Prácticamente todos los casos de cáncer de próstata corresponden a adenocarcinomas, cuya denominación se refiere a los tumores que se generan en el tejido epitelial. Este tipo de tumores son los más comunes en los humanos, debido probablemente a que la mayor parte de la proliferación celular se produce en el tejido epitelial. El adenocarcinoma prostático es multifocal (aparece simultáneamente en distintos sitios de la cápsula prostática), heterogéneo (presentando distintas subpoblaciones celulares a lo largo de su crecimiento) y en la mayoría de los casos se produce en la zona periférica de la glándula. El cáncer de

próstata y en general todas las patologías de esta glándula son de progresión muy lenta, así, en un proceso de desarrollo de cáncer, de un estadio normal hasta un estadio canceroso, pasando por varios grados de neoplasia prostática, pueden transcurrir incluso de 10 a 20 años [2, 3].

I.1.1. Diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata

En general, la detección temprana de cualquier tipo de cáncer es de suma importancia para realizar un tratamiento adecuado que permita aumentar la tasa de supervivencia y la calidad de vida de los pacientes. En el caso concreto del cáncer de próstata, cuando se diagnostica en una etapa temprana, es decir, el tumor se encuentra localizado en la glándula, la tasa de supervivencia a 5 años es del 100%. Por el contrario, cuando se detecta en una fase avanzada, en la cual el tumor ha traspasado la cápsula prostática alcanzando tejido adyacente, esa tasa se reduce al 30% [4]. En este sentido, los marcadores tumorales, también llamados biomarcadores de cáncer, juegan un papel muy importante.

I.1.1.1. Biomarcadores

Los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) de Estados Unidos definen biomarcador como cualquier característica que se mide y evalúa de forma objetiva como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica [5]. Desde un punto de vista bioquímico, un biomarcador se puede definir además como una sustancia que se encuentra en fluidos o tejidos biológicos en diferente concentración cuando se extrae de un paciente con una determinada enfermedad que cuando se extrae de un individuo sano [6]. Entre los biomarcadores pueden considerarse diferentes relaciones de proteínas, metilación en ADN, proporciones de metabolitos o cambios en mRNA que se puedan relacionar con alguna característica de la enfermedad y que preferiblemente se produzcan en el tejido afectado [7]. Por tanto, pueden ser usados

para el diagnóstico de la enfermedad como indicadores del estado y grado de un tumor canceroso, para el pronóstico del cáncer y además para monitorizar la respuesta al tratamiento aplicado y la posible recurrencia de la enfermedad una vez acabado éste. Algunos biomarcadores pueden utilizarse también para cribado de grandes poblaciones con fines preventivos. Los biomarcadores deben tener algunas características básicas para poder ser aceptados desde un punto de vista clínico: deben obtenerse de un modo no invasivo o mínimamente invasivo para el paciente, por ejemplo en sangre u orina, y el test para determinarlo debe ser exacto, sencillo, económico y reproducible. Además, dos de los factores más importantes de un biomarcador son la sensibilidad y la especificidad, que deben ser elevadas (próximas al 100%); éstas se pueden definir como el porcentaje de diagnósticos positivos y negativos respectivamente, identificados como verdaderos en una pequeña población [6].

La importancia de la sensibilidad y especificidad en los biomarcadores de cáncer radica en que algunos de ellos pueden estar también alterados en condiciones no cancerosas y, por el contrario, puede que no lo estén en todos los individuos con el mismo tipo de cáncer, especialmente en las fases tempranas de la enfermedad. La Agencia de Alimentación y Medicamentos de Estados Unidos (FDA), de referencia mundial, tiene aprobados sólo unos cuantos biomarcadores para algunos tipos de cáncer como testicular, hepático, pancreático, ovárico, de cervix, colorectal, tiroidal, de vejiga y para los más comunes, es decir próstata y mama [8, 9]. La gran mayoría de estos biomarcadores son proteínas de suero u orina, incluidas glicoproteínas.

El Instituto Nacional del Cáncer (NCI) en Estados Unidos ha creado una red con el fin de coordinar la investigación acerca del desarrollo de nuevos biomarcadores de cáncer en todo el mundo, la validación de éstos y los programas de cribado para estudios de población [10]. El NCI publicó en 2001 una propuesta para el proceso de desarrollo de un biomarcador de cáncer, que consta de cinco fases consecutivas [11]. En la primera fase, los estudios exploratorios preclínicos

identifican características del tumor que sean prometedoras para la detección del cáncer en tests clínicos. En la fase de validación y ensayo clínico, la enfermedad se puede detectar aplicando estos tests a individuos sanos y enfermos. En una tercera fase se realizan los estudios retrospectivos, en los que se evalúa la capacidad de pronóstico del biomarcador, es decir, si se puede realizar una detección temprana de la enfermedad antes de que sea clínica. En esta fase también se establece el concepto de positivo para la enfermedad (detección de la enfermedad en un estadio preclínico). En la cuarta fase o estudios prospectivos, se identifica el alcance del test realizado con el número de positivos detectados y las características de la enfermedad así como también el número de falsos positivos identificados (detección errónea de la enfermedad en el diagnóstico preclínico). En la última fase denominada control de cáncer, se cuantifica el impacto que produce el cribado de la población sobre la reducción en la incidencia del cáncer.

I.1.1.2. Biomarcadores del cáncer de próstata

El primer marcador del cáncer prostático que se propuso fue la fosfatasa ácida de próstata (PAP) en 1938 [12]. La PAP se utilizó hasta principios de los años 90, cuando cayó en desuso con la introducción del antígeno específico de próstata (PSA), un marcador más sensible y específico aprobado por la FDA para la monitorización y detección del cáncer de próstata en 1986, que se determina en suero mediante inmunoensayo en placa [13]. En febrero de 2012 la FDA aprobó la distribución comercial del ensayo PROGENSA PCA3 (prostate cancer gen 3), medido en la orina tras haber realizado un tacto rectal. Entre las proteínas que se han propuesto como marcadores de cáncer de próstata en fluidos o tejidos, pueden citarse también el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) [14], la glutatión S-transferasa π y la α -metilacil coenzima A racemasa [15, 16].

Actualmente, las principales herramientas a la hora de plantear una estrategia diagnóstica para la detección del cáncer de próstata corresponden al tacto rectal, la biopsia guiada por ecografía transrectal y la concentración en suero de PSA [17].

I.1.2. Antígeno específico de próstata

El antígeno específico de próstata o PSA es una glicoproteína de unos 28 kDa de peso molecular, con una única cadena de glicano unida al residuo asparagina-45 (Asn-45), que representa aproximadamente el 8% del peso molecular de la proteína y con un intervalo de punto isoelectrico (pI) entre 6,4 y 7,4 [18].

El PSA se produce fundamentalmente en las células epiteliales de la próstata y se secreta posteriormente al lumen de la glándula, donde constituye un componente mayoritario del plasma seminal, en una concentración entre 0,5-3 mg/ml [19]. Posee actividad proteolítica de tipo serina, pero es secretado como proPSA, que es inactivo y tiene una cadena de 244 residuos aminoácidos. En la próstata se secretan además varias proteasas que pueden activar el PSA por escisión de los siete primeros aminoácidos del proPSA [20]. Parte del PSA activo también puede sufrir proteólisis en el lumen de la próstata, generando algunas especies de PSA que son inactivas. Una vez activado, el PSA actúa sobre ciertas proteínas, como la semenogelina, que proporcionan la viscosidad al semen facilitando entonces la licuefacción de éste después de la eyaculación [21].

En condiciones normales, el PSA y sus formas inactivas prácticamente no se encuentran en la sangre debido a la secreción específica de las células epiteliales de la próstata, aunque una pequeña parte puede alcanzar el torrente sanguíneo. Sin embargo, en condiciones patológicas los vasos sanguíneos que rodean la próstata quedan accesibles al PSA cuando se produce una lesión de la membrana basal prostática, con la consecuente pérdida característica de las células basales en la glándula (Figura I.1). De este modo, se incrementa la cantidad de proPSA y PSA activo en la sangre respecto a condiciones normales [22].

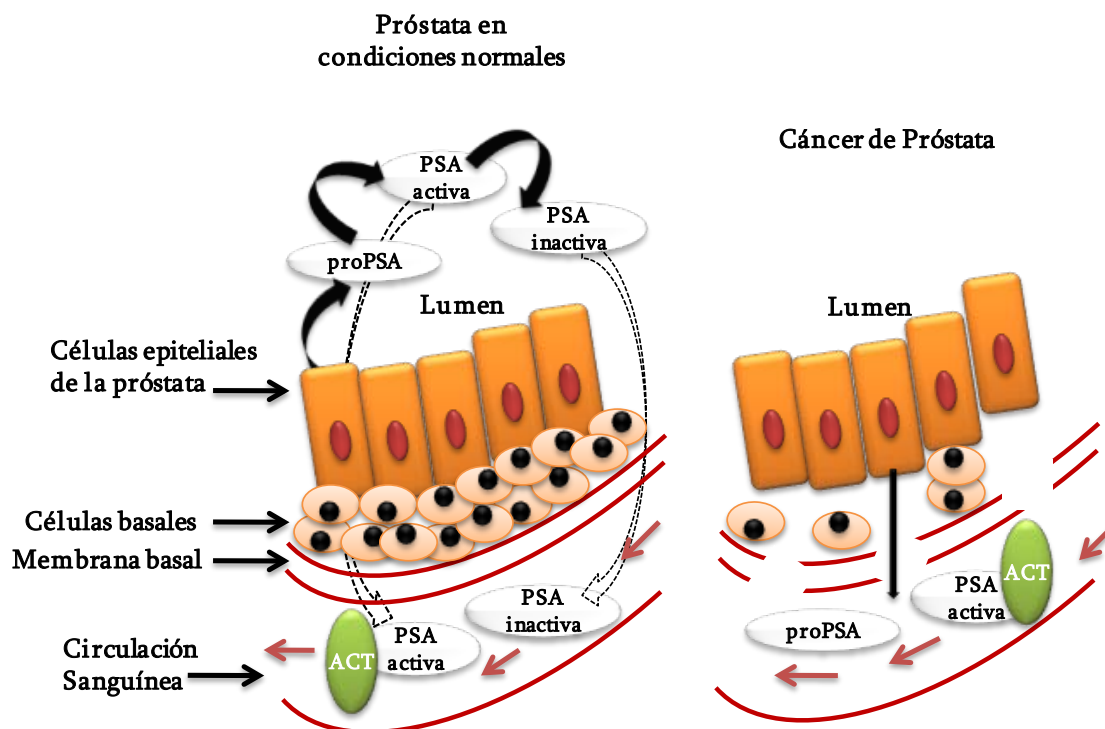


Figura I.1. Secreción del PSA en la próstata y su incorporación a la sangre en condiciones normales y de cáncer [22].

Entre el 70 y el 90% del PSA en sangre, correspondiente a PSA activo, se encuentra unido a inhibidores de proteasas, fundamentalmente a α -1-antiquimotripsina (ACT), formando un complejo de unos 80-90 kDa y en menor proporción a otros inhibidores como α -2-macroglobulina y α -1-antitripsina [22]. El PSA restante, que se puede encontrar en la sangre entre el 10 y el 30%, corresponde al PSA libre (fPSA). El fPSA está compuesto por un número mayor de especies que en el caso del PSA complejo, básicamente por formas inactivas de PSA el cual ha sufrido ruptura de enlaces peptídicos por diversos sitios y proPSA y sus formas denominadas truncadas, que corresponden a especies con diferentes longitudes en el propéptido, conocidas según el número de aminoácidos contenidos en éste como (-2), (-3), (-4) y (-7)proPSA [23]. La suma de ambos tipos, PSA complejada y fPSA, se denomina PSA total (tPSA) o comúnmente PSA en el diagnóstico del cáncer de próstata.

I.1.2.1. El PSA como biomarcador del cáncer de próstata

Como se ha comentado anteriormente, el nivel del PSA en sangre es el biomarcador que se utiliza actualmente para el diagnóstico del cáncer de próstata. Cuando la concentración de la proteína en suero supera el umbral de 4 ng/ml, en conjunción con el tacto rectal, se establece la sospecha de la presencia de cáncer de próstata. Este umbral en el nivel de PSA fue establecido a raíz de la aparición de un estudio en 1991, en el que se describía una incidencia de cáncer de próstata del 67% de los casos cuando el nivel de PSA era mayor de 10 ng/ml y la incidencia era elevada (22%) aún para una concentración de PSA entre 4 y 10 ng/ml [24]. No obstante, tanto en términos de especificidad como de sensibilidad es complicado establecer un umbral para el nivel de PSA adecuado a la detección del cáncer de próstata. Como se muestra en la Figura I.2, cuanto más aumenta la especificidad del diagnóstico, es decir el número de individuos que se identifican como verdaderos negativos, a medida que se aumenta el umbral de corte para la determinación del PSA, más se reduce la sensibilidad del test o el porcentaje de individuos identificados como verdaderos positivos [25, 26].

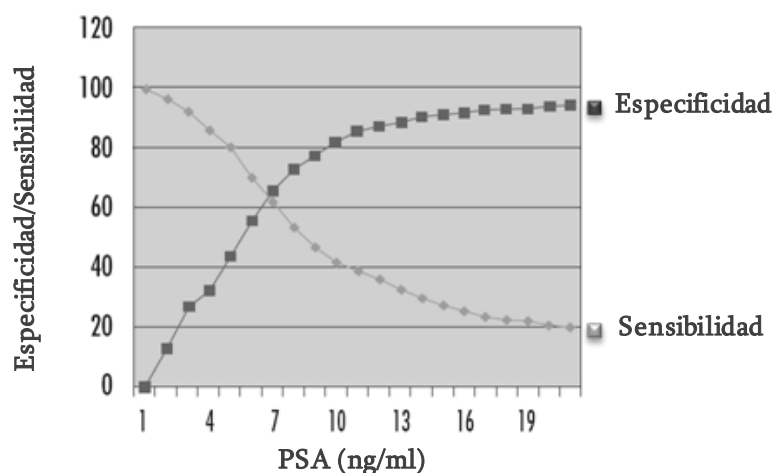


Figura I.2. Relación entre especificidad y sensibilidad en función del umbral utilizado en el test de PSA, realizado para 2.800 individuos que fueron sometidos a biopsia para confirmar la presencia o ausencia del cáncer de próstata [26].

En términos de especificidad, el mayor problema que plantea el umbral de PSA es que el aumento del nivel de proteína en suero se puede producir también en patologías benignas de la próstata, como la hiperplasia benigna de próstata (BPH) y la prostatitis [17, 27]. En este sentido, entre el 25-50% de los pacientes con BPH presentan niveles de PSA mayores de 4 ng/ml, generando un elevado riesgo de obtener falsos positivos en el diagnóstico de cáncer de próstata, lo que conduce a un número elevado de biopsias innecesarias [28]. En términos de sensibilidad, se ha comprobado además, que para valores menores del umbral de 4 ng/ml, entre 3-4 ng/ml, se produce una incidencia de cáncer de próstata en alrededor del 27% de los casos [29], que concuerda con lo observado en la Figura I.2 para la curva de sensibilidad. Según algunos autores, la repercusión de una falta de sensibilidad no parece ser tan importante, debido a que un paciente con síntomas de dolencia que resulte en un falso negativo, indicando la necesidad de una futura evaluación, tendrá una posibilidad muy elevada de estar en una fase poco avanzada del cáncer siendo todavía curable, cuando finalmente resulte en verdadero positivo [25]. Sin embargo, una baja especificidad, que conduce a un número elevado de biopsias innecesarias, puede suponer una influencia negativa en el estado de ánimo del paciente, ocasionar infecciones y otros riesgos asociados a este tipo de intervenciones y además supone unos gastos médicos elevados.

En cuanto a la repercusión de un cribado en la población basado en el nivel de PSA sobre la tasa de mortalidad, existe actualmente una clara controversia [30, 31]. Meta estudios recientes muestran conclusiones opuestas. Mientras que los estudios en la Unión Europea concluyen que el cribado con PSA reduce significativamente la mortalidad por cáncer de próstata, aunque muestran un riesgo de sobrediagnóstico [32-34], los estudios realizados en Estados Unidos indican que el cribado no supone mayor supervivencia para los pacientes con PCa [35-37].

A lo largo de las dos últimas décadas se han tratado de abordar diferentes estrategias para aumentar la especificidad del PSA, con objeto de diferenciar un

proceso de cáncer de próstata de un estado benigno, en particular de BPH. La llamada *zona gris*, correspondiente al intervalo 4-10 ng/ml de PSA en suero, es especialmente crítica debido a que son los valores de PSA en los que aparentemente se produce un mayor solapamiento entre las dos patologías [38]. En este sentido, la proporción de fPSA respecto al tPSA, denominado índice de PSA, es el único biomarcador aprobado por la FDA para la distinción clínica entre cáncer de próstata y BPH [8]. Otros biomarcadores propuestos para la mejora de la especificidad han sido la densidad de PSA, correspondiente a la relación entre el nivel de PSA en suero y el volumen prostático [39] y la velocidad de PSA, velocidad con que aumenta el nivel de PSA en suero por año [40]. Con el objeto de identificar los diferentes estados patológicos también se han investigado diferentes especies del PSA presentes en el suero, como el PSA complejo [41], fPSA [38, 39], el PSA benigno (bPSA) identificado como especie molecular específica de la BPH [42] y el proPSA [43, 44].

Con el fin de encontrar diferentes formas moleculares del PSA que se puedan utilizar para la detección de estados patológicos, se ha estudiado la glicosilación de la proteína como potencial biomarcador debido a que, como es actualmente bien conocido, la glicosilación producida en células tumorales presenta alteraciones respecto a la que tiene lugar en las células sanas [45]. La glicosilación es una modificación postraduccion (PTM) importante de las proteínas, ya que los glicanos presentes en las glicoproteínas intervienen en procesos celulares esenciales tales como la adhesión y la movilidad y también regulan procesos de comunicación intracelular y entre células con los tejidos circundantes. Por tanto, la glicosilación juega un papel importante en las etapas de progresión de un tumor, tales como la liberación de las células malignas del tumor primario, su desplazamiento a través del organismo y la anidación en otros tejidos. De hecho, como se comenta en la Sección I.1.1.1, la mayoría de los marcadores tumorales aprobados por la FDA corresponden a glicoproteínas [8, 9].

En el caso del PSA, las estructuras de su único N-glicano (Asn-45) han sido elucidadas por varias técnicas utilizando la proteína extraída de plasma seminal de individuos sanos [46-49]. Estas estructuras están caracterizadas por la presencia de ácido siálico, un pequeño porcentaje de N-acetilgalactosamina y una elevada incidencia de una unidad de fucosa en el núcleo común (consistente en dos residuos de N-acetilglucosamina y tres de manosa, y conocido normalmente con el término inglés *core*) del glicano. La cantidad variable de ácido siálico, un carbohidrato que proporciona carga negativa a la proteína, genera diferentes formas moleculares del PSA con diferente pI, que se pueden separar por técnicas electroforéticas como el isoelectroenfoque (IEF). Por otro lado, las principales diferencias que se han encontrado en la glicosilación del PSA entre individuos sanos y enfermos con cáncer de próstata, corresponden a una disminución en la presencia de fucosa en el *core* del glicano (“fucosa *core*”) y cantidades diferentes de ácido siálico [18, 50]. La electroforesis bidimensional en gel (2D-GE), dónde las proteínas se separan en función de su pI y su peso molecular, se ha utilizado en este sentido para estudiar diferentes formas del fPSA en suero de pacientes con cáncer de próstata y BPH [51, 52]. Las diferencias encontradas entre algunas de las formas podrían ser prometedoras para la distinción entre ambas enfermedades [45, 48, 53]. Estudios similares se han llevado a cabo para las distintas formas del tPSA en suero, una vez que se ha tratado éste para liberar el PSA del complejo formado con la ACT [54]. Un trabajo reciente basado en esta idea (estudio de las formas del tPSA después de la liberación del PSA del complejo con ACT) y que emplea la 2D-GE para separar las diferentes formas de PSA en suero de enfermos con cáncer de próstata y pacientes con BPH, apunta que las diferencias entre las proporciones de las formas de PSA podrían emplearse no solo para diferenciar cáncer de BPH, sino también para identificar el estadio en el que se encuentra el cáncer de próstata [53].

I.2. ELECTROFORESIS CAPILAR

En 1937, Tiselius mostró la primera separación electroforética de proteínas de suero humano [55]. Este estudio, aunque plagado de limitaciones, supuso el trabajo pionero en la técnica de electroforesis y que en las décadas sucesivas fue desarrollándose para abordar los problemas más significativos de los que adolecía, como eran: baja resolución, empleo de gran volumen de muestra y los bajos campos eléctricos necesarios para evitar las corrientes convectivas ocasionadas por el efecto Joule.

Muchos de los aspectos más relevantes de la electroforesis como técnica analítica fueron estudiados de manera independiente y simultánea por diversos autores [56]. En la década de los años 40 del siglo pasado, muchos de los trabajos se centraron en los problemas de convección que ocurren en la electroforesis en zona libre, al mismo tiempo que se presentó la electroforesis en papel como técnica adecuada para el análisis de una gran variedad de moléculas [57, 58]. En la década de los 50, se realizaron los primeros trabajos de electroforesis en gel [59], mientras se llevó a cabo el primer intento de isoelectroenfoque (IEF) [60], aunque en ausencia de anfólitos se consiguieron gradientes de pH muy cortos. A finales de esta misma década, en 1958, Hjertén presentó el primer instrumento para lo que sería posteriormente la electroforesis capilar (CE) [61]. También a finales de esta década, se introdujo la acrilamida como material de cribado en geles de electroforesis [62]. Durante los años 60 se empezaron a utilizar los anfólitos, cuyo desarrollo para IEF se atribuye a Svensson [63, 64], para las primeras separaciones efectivas por IEF de proteínas [65-67] y se introdujo el uso de dodecil sulfato sódico (SDS) como agente desnaturizante [68]. Una década después de la presentación del primer instrumento de Hjertén, éste publicó sus primeros resultados de la separación de proteínas en lo que hoy se conoce como CE [69], aunque estos primeros análisis se verían afectados por dos efectos nocivos para la separación. En primer lugar, por la sedimentación de las proteínas en el interior del tubo, lo que resolvió haciendo girar éste a 40 rpm, y

en segundo lugar, por importantes problemas de convección del medio líquido en que se llevaba a cabo la separación, ya que los capilares consistían en tubos de vidrio de 3 mm de diámetro interno. En 1975, se presentó por primera vez lo que se conoce como electroforesis bidimensional en gel (2D-GE), que corresponde a un IEF en un gel cilíndrico y a continuación una electroforesis de las proteínas así separadas, realizada en un gel plano de poliacrilamida mediada por SDS (SDS-PAGE) [70]. Algunos años después, como continuación de los trabajos de Hjertén, Virtanen dio un impulso al uso de capilares en electroforesis. El avance implicó reducir el diámetro del tubo a 0.2 mm, lo que supuso la eliminación de los fenómenos de convección [71]. Finalmente, a principios de los años ochenta, Jorgenson y Lukacs definieron los fundamentos teóricos que establecieron la electroforesis capilar como técnica analítica de separación y demostraron sus posibilidades como tal [72].

En las dos décadas posteriores a esta publicación, el número de trabajos en los que se empleó la CE como técnica analítica creció vertiginosamente. Este hecho se debió en parte a que la CE empezó a demostrar su utilidad para una variedad enorme de moléculas. Así, las separaciones electroforéticas en capilares se emplean actualmente para moléculas de elevado peso molecular, tales como proteínas o ácidos nucleicos, así como para moléculas más pequeñas como péptidos o bien compuestos orgánicos pequeños, incluso para iones inorgánicos [56]. Como consecuencia de ello, la CE es una técnica analítica utilizada hoy en día en campos de investigación tan diversos como la farmacología [73], alimentación [74], bioquímica [75] o medio ambiente [76], por citar sólo unos cuantos.

I.2.1. Fundamentos de la CE

I.2.1.1. El capilar de sílice

La electroforesis en capilares presenta importantes ventajas frente a su homóloga en geles. La primera de ellas es la posibilidad de automatización que tiene

la CE, mientras que en geles resulta difícil la automatización del proceso electroforético completo. Por otro lado, las características físicas del capilar, i.e., tubos de pequeño diámetro hechos de sílice fundida, con un recubrimiento externo de poliimida, le confieren a la técnica unas posibilidades muy amplias en cuanto a parámetros de separación. Así por ejemplo, el campo eléctrico aplicable, en el caso de geles, está muy limitado debido al calor generado por efecto Joule. En el caso de capilares, típicamente con 20-100 μm de diámetro interno (*id*) y 350-400 μm de diámetro externo (*od*), el efecto Joule está minimizado ya que la relación superficie/volumen es de 50-200 veces superior que en geles y la disipación del calor generado se produce de manera mucho más eficiente. Por ello, los campos eléctricos que se pueden aplicar están próximos a 1000 V/cm (30.000 V sobre 20-30 cm de capilar), unas 20 veces superior al que se usa en geles. Este hecho da lugar a que en CE se lleven a cabo separaciones en tiempos de análisis de minutos mientras que en los geles se requiere normalmente tiempos de análisis de horas.

1.2.1.2. Desplazamiento de las especies químicas en un capilar de sílice bajo la acción de un campo eléctrico

Uno de los modos de CE frecuentemente empleado desde los trabajos de Jorgenson y Lukacs es el de electroforesis capilar en zona libre (CZE). La separación por CZE se basa en las diferentes movilidades que presentan los distintos analitos de la muestra bajo la acción de un campo eléctrico en una solución tamponadora. La movilidad de cada especie química está condicionada por dos fenómenos, el desplazamiento electroforético y el desplazamiento electroosmótico.

El desplazamiento electroforético se puede determinar empleando la ley de Debye-Huckel-Henry, cuya expresión para la movilidad electroforética (μ_{ef}) de una molécula cargada se puede aproximar a:

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (\text{Ec. I.1})$$

donde q es la carga de la molécula, r su radio hidrodinámico y η la viscosidad del medio de separación. De la expresión se deduce que en un mismo medio, las moléculas con mayor carga y menor radio hidrodinámico tendrán movilidades mayores. En presencia de un campo eléctrico, la velocidad de migración (v_m) para una molécula cargada viene dada por:

$$v_m = \mu_{ef} E \quad (\text{Ec. I.2})$$

siendo E la intensidad del campo eléctrico aplicado, expresado en voltios por unidad de longitud de capilar.

Por otro lado, el desplazamiento de los analitos en el interior del capilar de separación está controlado también por el denominado flujo electroosmótico (EOF). Este fenómeno tiene su origen en la naturaleza iónica de la superficie de los capilares de sílice. La sílice presenta grupos silanol en la superficie de contacto con el tampón de separación. Estos grupos silanol se comportan como ácidos débiles con un pK_a en el intervalo de 4-6. El contacto de estos grupos cargados eléctricamente con los iones del tampón que actúa de electrolito, origina la denominada “doble capa eléctrica”. Esta doble capa, formada por los iones a ella asociados, está compuesta por dos zonas: la capa de Stern y la capa difusa. La capa de Stern o capa estacionaria está compuesta por cationes unidos de forma electrostática a la pared del capilar y sólo son eliminados por los lavados de regeneración del capilar (con NaOH, HCl, etc.). A continuación de esta capa se va acumulando otra capa de iones, la capa difusa o capa de Guy-Chapman, en la cual la concentración de cationes va disminuyendo a medida que se aleja de la pared del capilar. En esta segunda capa los iones están sueltos y pueden difundir con facilidad, en esa zona y en el tampón de separación. Como consecuencia de la formación de la doble capa eléctrica, en la proximidad de la pared del capilar hay una zona enriquecida en cationes que puede moverse con relativa

facilidad. En la Figura I.3 se muestra una representación esquemática de una sección de capilar en la que se refleja la teoría de la doble capa.

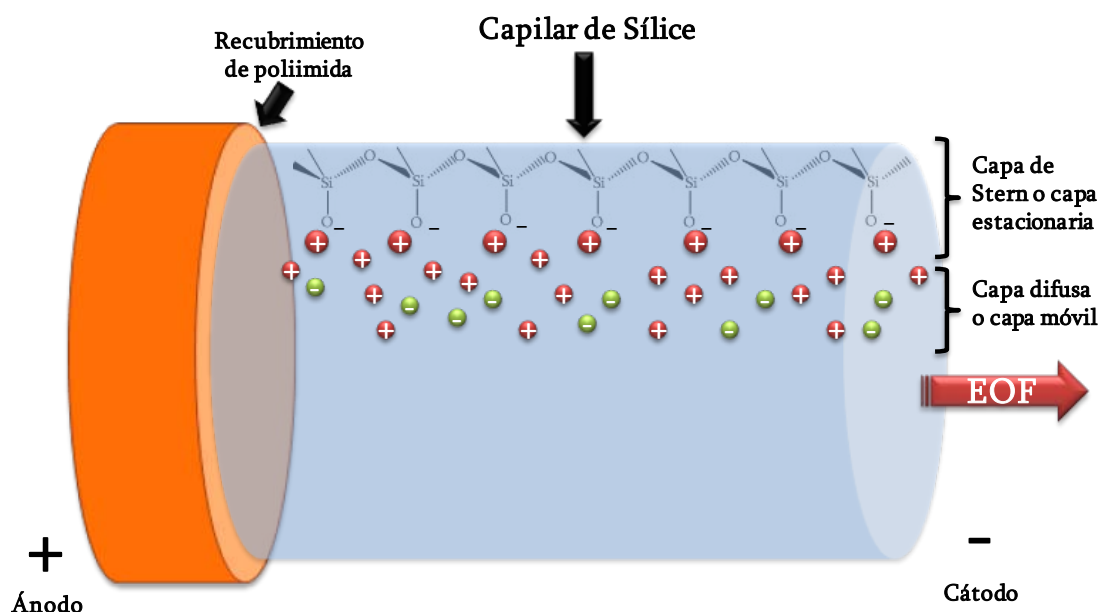


Figura I.3. Ilustración de la doble capa eléctrica, representada en uno de los lados de la sección, en un capilar de sílice fundida y generación del EOF bajo la acción de un campo eléctrico.

Cuando se aplica el campo eléctrico a lo largo del capilar, la capa de Stern permanece estática mientras que la capa difusa, enriquecida en cationes, experimenta un movimiento hacia el cátodo. El agua de solvatación que rodea a esos cationes experimenta el mismo movimiento, que debido a la unión por puentes de hidrógeno existentes entre el agua de solvatación y el agua presente en el tampón de separación, produce finalmente el movimiento de todo el líquido en el interior del capilar hacia el cátodo. Al flujo de tampón que así se origina se denomina EOF. La movilidad electroforética correspondiente a este EOF se expresa como:

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (\text{Ec. I.3})$$

donde ε_r es la constante dieléctrica relativa del tampón de separación, ε_0 la constante dieléctrica en el vacío y ζ el potencial zeta de la superficie, con valores de 1-10 mV y correspondiente a la diferencia de potencial entre la pared del capilar y un punto situado en el plano de Helmholtz, plano que separa las capas de Stern y difusa. De igual forma que para las moléculas cargadas, podemos definir la velocidad correspondiente al EOF (v_{EOF}) como:

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E \quad (\text{Ec. I.4})$$

De esta forma, se genera un flujo de líquido en el interior del capilar que generalmente es de unos pocos nanolitros/min y con un perfil de velocidades cuasi-plano. Debido al movimiento de todo el líquido, en la mayoría de separaciones por CE en zona libre todas las sustancias se moverán en el mismo sentido independientemente de su carga. Por esa razón, estando emplazado el detector próximo al cátodo, y controlando condiciones de separación tales como intensidad de E y μ_{EOF} , se podrán detectar cationes, moléculas neutras y aniones en una misma separación. Los analitos dentro del capilar experimentan una movilidad aparente (μ_{ap}) que se define como la suma vectorial de las movilidades electroforéticas para el analito y para el EOF:

$$\vec{\mu}_{ap} = \vec{\mu}_{ef} + \vec{\mu}_{EOF} \quad (\text{Ec. I.5a})$$

Si se considera el caso en que el sentido del desplazamiento electroforético sea opuesto al sentido del desplazamiento electroosmótico, es decir si se desarrolla la suma vectorial, la ecuación se puede expresar como:

$$\mu_{ap} = \mu_{ef} \pm \mu_{EOF} \quad (\text{Ec. I.5b})$$

donde μ_{ap} , μ_{ef} y μ_{EOF} son los módulos de los vectores correspondientes. De la misma forma, las ecuaciones se pueden expresar en términos de velocidad:

$$\vec{v}_{ap} = \vec{v}_{ef} + \vec{v}_{EOF} \quad (\text{Ec. I.5c})$$

$$v_{ap} = v_{ef} \pm v_{EOF} \quad (\text{Ec. I.5d})$$

De las expresiones se deduce que los cationes serán los primeros en alcanzar el detector, ya que su μ_{ef} va en el mismo sentido que el EOF. Las moléculas neutras serán detectadas en segundo lugar, ya que su μ_{ef} es nula. Éstas tienen la misma movilidad que el EOF, por lo que se utilizan en las separaciones electroforéticas para determinar su magnitud. En último lugar se detectan los aniones, que presentan una μ_{ef} de signo opuesto a la del EOF, siendo posible la detección si μ_{ef} es menor que μ_{EOF} . En condiciones en las que el EOF es nulo o muy bajo, los analitos se mueven única o fundamentalmente en función de su μ_{ef} .

I.2.1.3. Parámetros de separación en CE

Teniendo en cuenta la μ_{ap} podemos definir para un analito su tiempo de migración (t_m), como el tiempo que tarda en recorrer la distancia del capilar comprendida desde el punto de inyección al de detección, bajo la acción de un campo eléctrico de intensidad E . El valor del t_m viene dado por:

$$t_m = \frac{lL}{\mu_{ap} V} \quad (\text{Ec. I.6})$$

donde l es la longitud efectiva del capilar, es decir la distancia del punto de inyección al de detección, L es la longitud total del capilar y V el voltaje aplicado o diferencia de potencial. La intensidad del campo eléctrico viene dada por $E = V / L$.

El grado de separación de dos picos en CE, se puede expresar por la resolución (R_s), que suele calcularse a partir de la diferencia de t_m para ambos picos dividido por la media de la anchura de éstos a la línea de base (w):

$$R_s = 2 \frac{(t_{m2} - t_{m1})}{(w_1 + w_2)} \quad (\text{Ec. I.7})$$

El EOF juega un papel importante en la resolución, en el sentido en que condiciona el tiempo en que los analitos permanecen bajo la acción del campo eléctrico. Cuando el EOF es demasiado elevado, los analitos permanecen poco tiempo en el capilar, la diferencia en los t_m es pequeña y la resolución disminuye. En caso contrario, si el EOF es bajo las zonas discretas de analito pueden sufrir difusión originando el ensanchamiento de los picos e igualmente la resolución disminuye.

Otro parámetro relacionado con la calidad de la separación es la eficacia, que expresada en número de platos teóricos (N), se puede definir como:

$$N = \left(\frac{1}{\sigma} \right)^2 \quad (\text{Ec. I.8})$$

dónde σ es la desviación estándar, en longitud, del pico electroforético del analito. En una separación por CE, cuanto mayor es la eficacia para cada pico, menor es la anchura de éstos y por tanto la resolución entre picos adyacentes aumenta. Si los picos en un electroforegrama son Gaussianos, la eficacia puede expresarse mediante la ecuación:

$$N = 16 \left(\frac{t_m}{w_1} \right)^2 \quad (\text{Ec. I.9})$$

de la cual se puede deducir que cuanto mayor sea la anchura de un pico electroforético a la base, menor será la eficacia.

I.2.1.4. Aspectos fundamentales de instrumentación y metodología en CE

En la Figura I.4 se representa un esquema de la instrumentación utilizada en CE. Consta básicamente del capilar, viales con muestra y tampón de separación o electrolito de fondo (BGE), fuente de alto voltaje (0-30 kV), sistema de presión para la introducción de líquidos en el capilar, detector y sistema de adquisición de datos.

Previamente a la separación electroforética, el capilar se rellena con el BGE. El BGE es el medio en que va a tener lugar la separación, por lo que las propiedades de éste son críticas: su pH y su fuerza iónica son dos de los factores más importantes, pues permiten el control sobre la ionización de los analitos, modifican la magnitud del EOF, que afecta a la resolución, y determinan la conductividad del BGE, que a su vez controla el calor disipado en el capilar durante la separación. Además, existe un gran número de aditivos que pueden añadirse al BGE para aumentar, disminuir, cambiar de sentido o eliminar el EOF, para influir sobre las interacciones de los analitos con la pared del capilar o para seleccionar el modo en que se va a producir la separación.

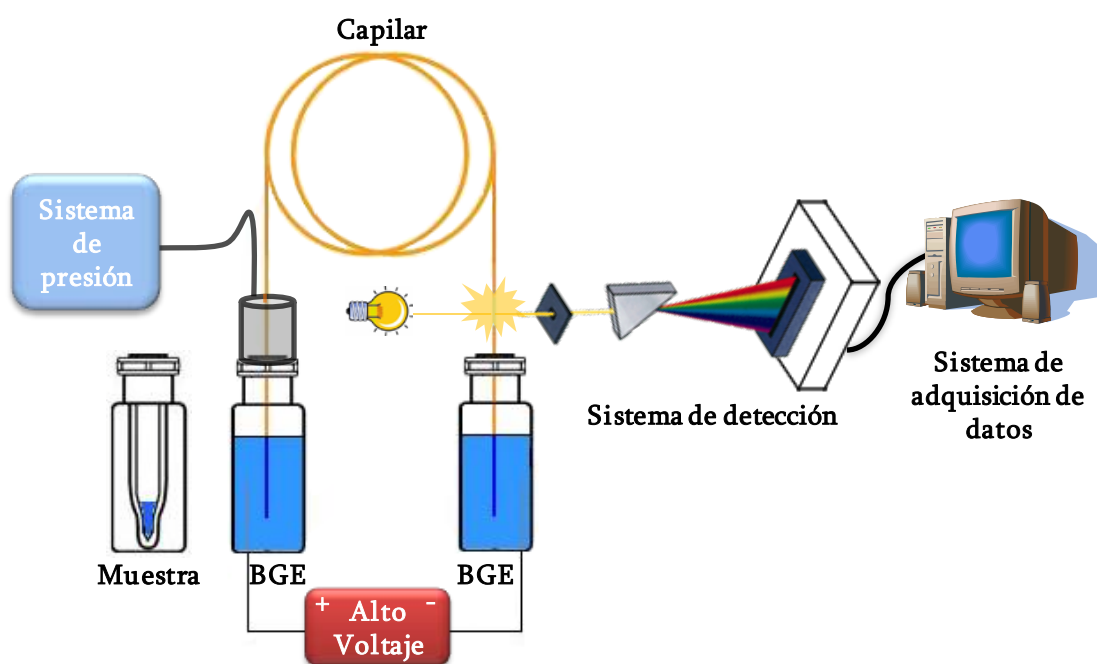


Figura I.4. Esquema de instrumentación básica utilizada en un sistema de CE.

En cuanto a la inyección, existen dos modalidades en CE. Una es la inyección hidrodinámica, en la que se aplica una pequeña presión (unos pocos milibares) al vial de muestra herméticamente cerrado y permite la introducción en el capilar de un volumen de muestra del orden de nL. La otra es la inyección electrocinética, en la que la muestra se introduce aplicando una pequeña diferencia de potencial (1-5 kV). La inyección electrocinética permite la introducción de volúmenes mucho menores que en el caso de la hidrodinámica, pero tiene el inconveniente de que se inyecta mayor cantidad de los analitos con mayor μ_{ap} . En cualquier caso, el volumen de inyección debe ser tal que la longitud que ésta ocupe en el capilar sea menor del 1-5% de la longitud del capilar para evitar pérdida de eficacia [77].

I.2.2. CE de proteínas

El análisis de proteínas por CE abarca muchas de las aplicaciones analíticas en el campo de estos biopolímeros. Además de hacer posible la separación de las proteínas y otros componentes de una muestra, permite la caracterización de sus propiedades, la identificación de diferentes isoformas de una misma proteína o el estudio de las interacciones de proteínas con otras biomoléculas [78]. De hecho, el análisis de proteínas, junto con el análisis y secuenciación del ADN, corresponde claramente al campo de aplicación más amplio y más estudiado de la CE. Sin embargo, algunas aplicaciones para proteínas son mejor abordadas por otras técnicas como son la 2D-GE, ensayo de inmunoabsorción con enzimas (ELISA), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o espectrometría de masas (MS). Pensando en el futuro y teniendo en cuenta la metodología desarrollada durante los últimos años, orientada a la mejora de sensibilidad en la detección y especificidad en el análisis de proteínas en muestras biológicas complejas, la CE promete un papel importante en la búsqueda de nuevos biomarcadores de enfermedades.

El término CE, aunque a menudo se utilice indistintamente para referirse al modo CZE, se refiere también a cualquier técnica analítica de electromigración que

ocurre en el interior de un capilar [79]. Así, dependiendo del BGE utilizado en la separación podemos encontrarnos una gran variedad de modos como la CZE, isoelectroenfoque capilar (CIEF), isotacoforesis capilar (CITP), cromatografía electrocinética micelar (MEKC), electrocromatografía capilar (CEC), electroforesis capilar por tamizado (CSE) o electroforesis capilar de afinidad (ACE). Dependiendo de la aplicación deseada para la separación de proteínas, basta con cambiar el capilar y el BGE y se puede desarrollar cualquiera de los modos con la misma instrumentación de CE. Para el análisis de proteínas, los modos que ofrecen una mayor eficacia con respecto a las técnicas convencionales son CZE, CIEF o MEKC y en términos operacionales la CSE, ofrece unas enormes ventajas frente a los métodos convencionales de separación por tamaño. Estos cuatro modos de CE son los más utilizados en análisis de proteínas.

En CZE, el modo más frecuente, las moléculas de proteína se separan fundamentalmente en función de su relación carga/tamaño, es decir, las moléculas más cargadas y con menor radio hidrodinámico en el BGE utilizado presentarán una mayor movilidad. Como se ha indicado anteriormente, en las separaciones por CZE, las proteínas se separan bajo la acción de dos fuerzas, las debidas a la μ_{ef} y al EOF y tanto la eficacia como la selectividad en la separación se pueden modificar ajustando el pH y la fuerza iónica del BGE. Pero uno de los mayores problemas a la hora de separar proteínas por CZE, es la interacción que se produce entre éstas y los grupos silanol desprotonados en la pared del capilar. A pH básico, estas interacciones se hacen más importantes, lo que produce la adsorción de las proteínas y el ensanchamiento de los picos, lo que origina una pérdida de resolución en la separación. Una solución a este problema es el empleo de BGE con pH inferior a 3, por debajo del cual los grupos silanol están mayoritariamente protonados y las interacciones electrostáticas con las proteínas se minimizan [80]. Sin embargo, a estos valores de pH el EOF se reduce casi hasta eliminarse y en consecuencia los tiempos de análisis aumentan. Además, trabajar a esos pHs tan ácidos limita el

análisis de ciertas proteínas, por ejemplo de las que se quiere obtener la separación de sus diferentes isoformas, las cuales presentan cada una un pI muy próximo al de las demás y la mayor eficacia de separación se obtiene a un pH ligeramente superior o inferior a su intervalo de pI. Para evitar la adsorción de proteínas a la pared del capilar, existe otra posibilidad que se viene estudiando desde hace más de dos décadas y que se ha convertido en un auténtico arte. Se trata del empleo de sustancias que se unen a la pared del capilar por mecanismos diversos y que evitan la adsorción de las proteínas a ésta. Dichas sustancias se pueden emplear como recubrimiento dinámico, que se regenera en cada análisis, o bien como recubrimiento estático, que se unen fuertemente a la pared del capilar, covalente- o no covalentemente, y no se eliminan después de cada separación. Las sustancias más comúnmente empleadas para evitar la adsorción de las proteínas al capilar son las diaminas primarias de alcanos [81], que utilizadas como recubrimiento dinámico del capilar se unen de manera reversible y muy eficientemente a la sílice, en un amplio intervalo de pH.

El mecanismo de separación en CSE está basado en fuerzas de fricción y fuerzas en las que intervienen la masa y el radio hidrodinámico de la proteína. Los capilares empleados en este modo de separación tienen la pared interna recubierta, con el fin de eliminar el EOF. La electroforesis capilar en gel (CGE), un modo de CSE característico en el que se utilizaba una red de polímero entrecruzado, aunque llegaron a alcanzarse con ella eficacias elevadísimas [82], fue desechada debido a la falta de reproducibilidad y baja durabilidad que proporciona a los capilares [83]. Actualmente en CSE, se añade un polímero hidrófilo al BGE a una determinada concentración a la cual las interacciones moleculares entre las cadenas del polímero permiten la formación de una red. Esta red polimérica actúa de tamiz molecular y permite separar las diferentes proteínas por su tamaño. El polímero se puede eliminar del capilar entre inyecciones, siendo los compuestos más usados poli(acrilamida) lineal, dextrano, metilcelulosa y óxido de polietileno. Para las

separaciones por CSE, las proteínas son desnaturalizadas y unidas a SDS, de modo que todas ellas tendrán aproximadamente la misma relación carga/tamaño y se movilizarán fundamentalmente por su tamaño.

En el modo CIEF, las proteínas se separan en función de su pI gracias a un gradiente de pH creado en el interior del capilar mediante una mezcla de anfólitos. Cuando se aplica el campo eléctrico entre el ánodo y el cátodo en el capilar lleno de la mezcla de anfólitos, con un pH homogéneo en todo el capilar, cada anfólitico migra, generando un gradiente de pH, hasta alcanzar una zona en la que éste es igual a su pI. Cuando todos los anfólitos alcanzan la zona en que el pH es igual a su pI, adquieren carga global neutra y se dice que alcanzan un estado estacionario. De esta forma los anfólitos, debido a sus propiedades ácido-base, establecen el pH de cada zona a lo largo de todo el capilar. Existen distintos modos de introducir la muestra en el capilar, siendo la más habitual la que consiste en mezclar ésta con los anfólitos y rellenar con esa muestra el capilar. Las moléculas de proteína de la muestra con pI diferentes migrarán, de igual forma que los anfólitos, hasta alcanzar su zona de enfoque, es decir la zona del capilar en la que el pH corresponde a su pI. Una vez se ha producido el enfoque, el líquido en el interior del capilar se moviliza para hacer pasar los analitos por la ventana de detección. Los anfólitos (generalmente ácidos poliaminocarboxílicos) presentan diferencias muy pequeñas en sus pIs, lo que permite una elevada resolución de proteínas en base a su pI y es especialmente interesante para la separación de isoformas de una misma proteína que difieren en pI debido por ejemplo a modificaciones postraduccion [84-87].

La separación de los analitos en el modo de MEKC se basa fundamentalmente en su diferente hidrofobicidad. La separación está controlada por el EOF, la μ_{ef} del analito y la micela y las interacciones entre analitos y micelas formadas por detergentes añadidos al BGE [88]. Cuando las moléculas de proteínas con diferentes hidrofobicidades se movilizan bajo la acción del campo eléctrico, se distribuyen diferentemente entre las micelas y la fase hidrófila. Las proteínas más hidrófilas, que

no interaccionan con las micelas, migran de acuerdo con su μ_{ef} en el BGE y a la velocidad del EOF, mientras que las proteínas hidrófobas que estén totalmente asociadas a las micelas, migran a la velocidad de éstas.

I.2.3. Detección de proteínas en CE

Con la CE se puede alcanzar un límite de detección (LOD) en masa muy bajo, debido a los volúmenes tan pequeños que se requiere inyectar para realizar las separaciones (del orden de nanolitros). Este aspecto la hace muy interesante en el campo de aplicación de análisis de proteínas en muestras biológicas, ya que con una muestra de pocos microlitros se puede hacer un elevado número de análisis. No obstante, el LOD en concentración para la detección ultravioleta/visible (UV-Vis) es muy limitado, debido a que las dimensiones del propio capilar representan un camino óptico típicamente de 25-75 μm , correspondiente a su diámetro interno. Por esta razón, aunque la detección UV-Vis sigue siendo la más utilizada para análisis de proteínas, durante las dos últimas décadas se han desarrollado tanto metodología como instrumentación para mejorar la sensibilidad. Esta mejora es claramente necesaria para detectar muchas proteínas de interés que se encuentran en los fluidos biológicos a concentración del orden nM o inferiores. Entre las estrategias para mejorar la sensibilidad en análisis de muestras biológicas, existen varios métodos de preconcentración en el interior del capilar, basados tanto en cromatografía como en electromigración [89]. Por otro lado, en el caso de empleo de métodos de detección óptica en CE, el capilar de sílice fundida ofrece mucha versatilidad debido a que este material presenta una alta transmitancia en la mayor parte del espectro UV-Vis [90]. En la Tabla I.1 se muestra un resumen de los métodos más utilizados en CE para detección de proteínas, con sus correspondientes intervalos de LOD en masa y concentración. En el presente apartado se describen únicamente dos de las técnicas de detección, UV-Vis y fluorescencia inducida por láser (LIF), empleadas a lo largo del trabajo presentado en esta memoria.

Tabla I.1. LOD para las diferentes técnicas de detección empleadas en CE, considerando un volumen de inyección de 10 nL [91].

Detección	LOD (moles)	LOD (M)
Absorción UV-Vis	$10^{-13} - 10^{-15}$	$10^{-5} - 10^{-7}$
Fluorescencia	$10^{-15} - 10^{-17}$	$10^{-7} - 10^{-9}$
Fluorescencia inducida por láser	$10^{-18} - 10^{-20}$	$10^{-10} - 10^{-12}$
Conductividad	$10^{-15} - 10^{-16}$	$10^{-7} - 10^{-8}$
Espectrometría de masas	$10^{-16} - 10^{-17}$	$10^{-8} - 10^{-9}$
Detección indirecta	10-100 veces inferior a la detección directa correspondiente	
• UV		
• Fluorescencia		

I.2.3.1. Detección UV-Vis

Este método se basa en la espectroscopía de absorción de luz ultravioleta o visible por parte de los analitos y, como ya se ha comentado, es el método de detección más utilizado en CE en general y en particular para el análisis de proteínas. Como también se ha mencionado, tiene una limitación importante debido al camino óptico que impone el diámetro interno del capilar, reduciendo la cantidad de luz que atraviesa los analitos en la ventana de detección. La señal obtenida de este detector (absorbancia, A) viene dada por la ley de Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon b C \quad (\text{Ec. I.10})$$

donde ε es el coeficiente de extinción molar, b el camino óptico y C la concentración de analito. Esta ecuación muestra la importancia del camino óptico en la sensibilidad

de la detección UV-Vis. Algunos diseños de capilares pueden aumentar la sensibilidad en CE, mediante la construcción de una célula de detección que incrementa el *id*, como la célula de burbuja, o bien aumenta la longitud del camino óptico mediante la disposición del capilar en la ventana de detección, como la célula en Z.

Aunque ofrece baja sensibilidad, este método es tan popular debido a su sencillez y bajo coste respecto a otros detectores más sensibles y debido a que se acopla fácilmente al instrumento para realizar la detección en columna, a través de la ventana de detección practicada en el capilar. Además, la mayoría de los instrumentos comerciales de CE se suministran con detectores UV-Vis que poseen filtros ópticos, limitando la transmitancia a longitudes de onda específicas, y también detectores con tecnología de fila de diodos (más conocidos por el término inglés *diode array*), que permiten la detección a múltiples longitudes de onda simultáneamente. En la región UV-Vis del espectro, las proteínas se detectan generalmente a 214 ó 280 nm, longitudes de onda que corresponden a sus dos máximos de absorción debidos al enlace peptídico y a la presencia de aminoácidos aromáticos, respectivamente. Adicionalmente, algunas proteínas poseen grupos prostéticos con máximos de absorción a determinadas longitudes de onda, que pueden aprovecharse para aumentar la especificidad de su detección.

I.2.3.2. Detección LIF

La fluorescencia es el fenómeno por el cual una molécula que ha sido excitada por una fuente de luz desde el estado fundamental al estado excitado, vuelve a su estado fundamental mediante la emisión espontánea de radiación en forma de fotones, con una longitud de onda superior a la de la luz de excitación. La intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de sustancia fluorescente, al camino óptico, a la potencia de la radiación de excitación y al rendimiento cuántico

de la sustancia fluorescente, es decir, la cantidad de fotones que emite la molécula respecto a la cantidad de fotones que absorbe.

En 1981, Jorgenson y Lukacs usaron el primer detector de fluorescencia en CE, para el cual utilizaron una lámpara de mercurio como fuente de excitación [72]. Las lámparas proporcionan un amplio intervalo de longitudes de onda, con lo que seleccionando un filtro adecuado se puede tener una longitud de onda de excitación para cada aplicación deseada. Sin embargo, debido a la falta de direccionalidad con que la lámpara emite la radiación, no proporciona una potencia suficiente para focalizar en las reducidas dimensiones del capilar [92].

Las lámparas fueron pronto sustituidas por una fuente que proporcionaría una relación energía/superficie de excitación mayor. En 1985, se utilizó por primera vez un láser como fuente de excitación para la detección por fluorescencia en CE [93], estableciéndose la técnica que hoy conocemos como CE con detección por fluorescencia inducida por láser o CE-LIF. Recientemente, también se han comenzado a emplear los LED (*Light-Emitting Diodes*) como fuente de excitación en CE [94, 95] que tienen elevada potencia luminosa, aceptable direccionalidad (ángulo de emisión de luz $<180^\circ$) y bajo coste.

Los aspectos más interesantes de un láser para su uso en CE-LIF radican en la elevada direccionalidad y la coherencia (fotones emitidos en la misma fase) con que se emite la radiación, consiguiendo unos haces de luz extremadamente pequeños, lo que lo hace perfecto para focalizar el haz en la ventana de detección de un capilar. Además, la luz que emite es monocromática con lo que en la mayoría de ocasiones no es necesario un filtro de excitación. El haz del láser puede ser conducido desde la fuente por una fibra óptica y se enfoca en la ventana de detección mediante una lente o un objetivo de microscopio.

Durante las dos últimas décadas, las fuentes más usadas han sido los láseres de gas, debido a su robustez y estabilidad, larga vida y al amplio intervalo de longitudes de onda que abarcan entre 300 y 650 nm [96]. Pueden destacarse, los láseres de He-

Cd (325 y 442 nm), He-Ne (543, 593 y 633 nm) y Ar⁺ (488 y 514 nm) con potencias que se pueden ajustar en un intervalo de 0,5-50 mW [97]. En los últimos años, los láseres de gas han sido sustituidos por otros tipos de fuente, como los láseres de semiconductores (por ejemplo los diodos láser) o los láseres DPSS (*Diode-Pumped Solid State*) como es el de Nd-YAG (*Yttrium Aluminium Garnet*), debido a que además de proporcionar un intervalo más amplio de longitudes de onda, 266-1000 nm, son más baratos que los anteriores, son mucho más compactos y proporcionan suficiente potencia para la detección LIF en CE [98].

Para obtener el máximo rendimiento de la detección LIF en CE y alcanzar así un excelente LOD, es importante la configuración de los componentes ópticos en el detector. De esta forma, durante las últimas décadas se han investigado varias configuraciones posibles como la ortogonal, en la que la detección se realiza en un plano perpendicular al plano de excitación [99]; la colineal, donde la detección se produce en la dirección del haz de excitación [100]; la axial, en la que el haz de excitación entra en el capilar en la dirección del flujo de líquido [101]; o mediante una cubeta de vena líquida, donde la detección se realiza post-capilar, es decir, a la salida del capilar [102, 103].

Antes de llegar al sensor de luz, en cualquiera de las configuraciones, la luz emitida por la muestra atraviesa una serie de elementos ópticos que suelen ser un objetivo de microscopio, un filtro de vidrio de color y un filtro interferométrico. El objetivo de microscopio colecta la luz que sale del capilar y la enfoca hacia el sensor de luz. La luz colectada, además de la fluorescencia, lleva también luz de excitación dispersada por las paredes del capilar y el líquido en su interior. Por esta razón se coloca un filtro de color después del objetivo, que impide el paso de luz del láser dispersada por el capilar. El filtro interferométrico, deja pasar solo la luz en el intervalo de longitudes de onda en torno a la de fluorescencia del analito.

En el sensor de luz, los fotones colectados son transformados en una corriente eléctrica, lo que finalmente proporciona la señal analítica. El detector más usado en

CE-LIF, por su elevada sensibilidad y velocidad de respuesta, es el tubo fotomultiplicador (PMT). El PMT es un tubo al vacío que consiste en un cátodo fotoemisor o fotocátodo, seguido de una serie de ánodos llamados dínodos y un ánodo colector de electrones. Cuando la luz incide sobre el fotocátodo, salen de éste los electrones arrancados por el fotón incidente e inmediatamente después de entrar en el tubo al vacío, los electrones sufren una aceleración debido al campo eléctrico y alcanzan el primer dínodo con una energía mayor. Los dínodos sucesivos tienen un potencial mayor cada vez, produciendo un efecto cascada con un número de electrones cada vez mayor. Finalmente el ánodo colector recoge todos los electrones emitidos y se mide la señal amplificada en forma de voltaje. Otros detectores que están viendo incrementar su uso en los últimos años son los fotodiodos de avalancha (APD) o las cámaras CCD (*charge-coupled devices*). Los APD se usan fundamentalmente para alcanzar detección ultrasensible [104], mientras que las cámaras CCD se usan principalmente para lo que se denomina en inglés *whole channel imaging*, que corresponde a la detección en toda la longitud de separación [105], o bien para separaciones simultáneas en diferentes capilares [106].

I.2.4. Detección fluorescente para el análisis de proteínas por CE

Para realizar la detección LIF de proteínas en CE pueden emplearse tres estrategias diferentes: detección por fluorescencia nativa, detección por fluorescencia indirecta o bien la derivatización fluorescente con reactivos fluoróforos o fluorogénicos.

La fluorescencia nativa es una herramienta a menudo práctica para la detección de proteínas en CE-LIF. Las proteínas contienen aminoácidos aromáticos, fundamentalmente tirosina y triptófano, que proporcionan un máximo de excitación entre 260-280 nm y un máximo de emisión entre 300-350 nm. Como fuente de excitación puede utilizarse un láser de Ar^+ que tenga una emisión suficientemente intensa a 275 nm o el mismo láser trabajando a 514 nm con la frecuencia doblada a

257 nm. Sin embargo, una opción más asequible económicamente puede ser un láser DPSS de Nd-YAG pulsado a 266 nm [107]. El LOD que se obtiene puede ser bastante aceptable para el análisis de proteínas minoritarias en muestras biológicas, a nivel de concentración nM, aproximadamente de 2 a 3 órdenes menor del que se obtiene con detección UV. Swaile y Sepaniak fueron los primeros que utilizaron la detección de proteínas por LIF en CE con un láser de Ar⁺ a 257 nm, obteniendo un LOD de 0,25 nM para ovotransferrina [108]. Algunos años después, con un láser semejante con emisión a 275 nm, se alcanzó un LOD en masa de 73 amol para insulina [109], aplicado al análisis de una única célula. Un LOD comparable se obtuvo también para ovotransferrina y albúmina sérica bovina (BSA) empleando en este caso un láser de estado sólido pulsado con emisión a 266 nm [110].

Pero el triptófano, el aminoácido con mayor rendimiento cuántico, suele tener una abundancia baja en proteínas [111] y además puede existir una gran variabilidad entre proteínas respecto a la cantidad de aminoácidos aromáticos. Por otro lado, la detección por fluorescencia nativa de proteínas en muestras biológicas se complica debido a la gran cantidad de impurezas presentes que, junto con las impurezas de la pared de sílice del capilar o del BGE, producen fluorescencia en la región 260-275 nm, lo que origina un elevado ruido de fondo en el electroforegrama y disminuye la sensibilidad [112]. Además, los láseres que se utilizan normalmente para excitar en la región UV, son en general más caros que los empleados en la región del visible. Finalmente, la detección de fluorescencia nativa de proteínas no puede definirse como un método universalmente sensible, ya que la emisión fluorescente de estos biopolímeros en el UV depende del número de aminoácidos aromáticos que posea, los cuales tienen un rendimiento cuántico relativamente bajo y por otro lado son los menos abundantes en la naturaleza.

La fluorescencia indirecta es una técnica de detección universal ya que los analitos no han de tener grupos fluoróforos y además no es necesaria su derivatización fluorescente. La detección por fluorescencia indirecta en CE se

produce cuando los analitos desplazan de la banda de muestra durante la separación a un compuesto fluorescente que se añade al BGE, lo que produce una disminución de intensidad de señal en el detector [113]. El LOD en concentración para la detección de un analito por fluorescencia indirecta, C_{LOD} , viene definido por la ecuación I.11:

$$C_{LOD} = \frac{C_p}{TR \times DR} \quad (\text{Ec. I.11})$$

dónde C_p es la concentración del compuesto fluorescente en el BGE, TR es la relación de transferencia y DR es la reserva dinámica [114]. TR es el número de moles de compuesto fluorescente desplazados por mol de analito, con lo que un valor elevado proporciona una disminución de fluorescencia en el detector también elevada y una mayor sensibilidad, como se puede deducir de la ecuación I.11. DR se define como la relación entre la señal de fondo y el ruido de fondo, y corresponde con el parámetro más crítico en este tipo de detección. Como se puede deducir también de la ecuación I.11, un valor elevado de DR proporciona una mayor sensibilidad. Esto se puede conseguir con una señal de fondo elevada, es decir, una intensa emisión fluorescente de fondo en el BGE, o con un ruido de fondo pequeño. Fluctuaciones en la potencia de emisión del láser, dan lugar a una fluorescencia de fondo inestable y conducen a un ruido elevado en la línea de base, hecho que en la detección por fluorescencia directa es prácticamente despreciable. En definitiva, la fluorescencia indirecta en CE resulta ser al menos dos órdenes de magnitud menos sensible que la fluorescencia directa [113]. De hecho, su uso ha sido muy limitado desde los primeros trabajos publicados [114, 115], y sólo parece ser interesante para la detección de analitos muy complejos de derivatizar, como son los iones inorgánicos. La primera publicación en la que aparece la detección por fluorescencia indirecta de una proteína en CE-LIF, presenta una sensibilidad en torno al μM para

lisozima, muy similar a la que se obtiene en CE para proteínas con detección UV. Este tipo de detección no se ha empleado para más proteínas.

A la vista de las limitaciones que tienen la detección fluorescente nativa y la detección fluorescente indirecta de proteínas, que se han descrito en los párrafos anteriores, no es de extrañar que se haya recurrido a la técnica de la derivatización con sustancias fluorescentes para tener un buen LOD de proteínas por LIF. El uso de sondas o colorantes para la derivatización o marcado fluorescente de péptidos y proteínas para su análisis por CE-LIF está muy extendido y se pueden encontrar publicados varios trabajos y reviews especializados en este campo [96, 107, 113, 116]. No obstante, la derivatización de proteínas plantea dos problemas importantes. En primer lugar, la limitación cinética que tiene la reacción de los colorantes con proteínas en disoluciones muy diluidas, que origina bajos rendimientos de la reacción de derivatización y conduce a LOD demasiado elevados, en muchos casos comparables a la detección UV a pesar de la elevada sensibilidad de la detección LIF [116]. En segundo lugar, debido a que una proteína tiene múltiples grupos funcionales (por ejemplo, varios grupos amino) que pueden reaccionar covalentemente de manera ligeramente distinta con el mismo colorante, muchos de los procedimientos de derivatización empleados con las proteínas conducen a productos de reacción múltiples [117]. Para un número n de posibles grupos reactivos de una proteína (por ejemplo, amino) en su cadena polipeptídica, habrá $2^n - 1$ posibles productos de derivatización covalente [118], y cada uno de ellos puede tener una movilidad electroforética diferente. La formación de múltiples derivados de la proteína puede ocasionar la aparición de múltiples picos o el ensanchamiento de los picos electroforéticos disminuyendo drásticamente la eficacia de la separación. Durante las tres últimas décadas y aún actualmente, se han abordado numerosos procedimientos de derivatización fluorescente para intentar salvar estas dos grandes limitaciones.

I.2.4.1. Modos de derivatización fluorescente en CE-LIF

Los diferentes modos de derivatización para el análisis por CE-LIF de proteínas se pueden clasificar en tres tipos: pre-capilar, en-capilar y post-capilar.

La derivatización pre-capilar, como su nombre indica, se realiza fuera del capilar y es previa a la separación electroforética. Es el más versátil de todos los métodos de derivatización. Se puede emplear tanto para reactivos fluoróforos como para fluorogénicos. La diferencia entre ambos reactivos es que los primeros emiten fluorescencia *per se*, con un rendimiento cuántico considerable, y los segundos sufren un aumento drástico en su rendimiento cuántico cuando están unidos al analito, ya sea de forma covalente o no-covalente. Puesto que en el modo pre-capilar puede eliminarse el exceso de reactivo fluoróforo previamente a la inyección de la muestra en el capilar, este exceso no suele interferir en la separación de proteínas. Por otro lado, este modo permite una gran variedad de condiciones de reacción, por lo que es recomendable cuando se requieren temperaturas de reacción elevadas o tiempos de reacción largos. Por estas razones, este modo de derivatización es aún el más usado.

El modo de derivatización en-capilar se lleva a cabo utilizando las diferencias en movilidad electroforética que existen entre el colorante y las moléculas de proteína. En este procedimiento, una vez inyectados de forma consecutiva muestra y colorante en el capilar, el segmento de disolución (en terminología inglesa "*plug*") de colorante se hace pasar a través del *plug* de muestra mediante la aplicación de un campo eléctrico durante un tiempo de mezcla. A continuación se interrumpe el voltaje para permitir durante el tiempo de reacción, que las sustancias mezcladas reaccionen. Transcurrido el tiempo de reacción, que puede ser de unos pocos segundos a varios minutos, el(los) producto(s) de reacción se lleva(n) al punto de detección aplicando el voltaje de separación, de forma que se produce la separación de la muestra en sus componentes ya derivatizados. Este procedimiento se denomina microanálisis controlado electroforéticamente o EMMA [119]. En este

procedimiento se usan preferentemente reactivos fluorogénicos ya que los fluoróforos pueden interferir luego en la detección de los productos fluorescentes. Otro procedimiento para llevar a cabo la derivatización en-capilar es incluir el reactivo fluorogénico en el BGE [120]. Éste se aplica especialmente para reactivos que se unen a la proteína por derivatización no-covalente, con una elevada rapidez. Las proteínas migran hacia el punto de detección y se unen al reactivo fluorogénico a lo largo de toda la distancia de separación. En general, el modo en-capilar se utiliza para derivatizar volúmenes extremadamente pequeños de muestra (del orden de nanolitros), mejora además el rendimiento de reacción ya que el confinamiento en el reducido volumen del capilar reduce el efecto de dilución al mínimo y permite la automatización del, a veces tedioso, proceso de derivatización. Las limitaciones más importantes de este método son las impuestas por el propio método electroforético, es decir, no pueden aplicarse temperaturas extremas ni tiempos de reacción excesivamente largos, además las condiciones óptimas de reacción no son compatibles en muchas ocasiones con el BGE utilizado para la separación.

La derivatización post-capilar se realiza a la salida del capilar, después que la separación electroforética ha tenido lugar. Resulta muy útil para evitar la interferencia de subproductos de reacción en la separación y puede evitar el ensanchamiento de picos producido por los múltiples derivados en la derivatización de proteínas. Por otro lado, este modo puede producir pérdida de eficacia, reacciones incompletas y ruido elevado en la línea de base [116]. Por estas razones, suelen usarse en este modo reactivos fluorogénicos que se unen a proteínas muy rápidamente. La cubeta de vena líquida parece ser el reactor más conveniente ya que los autores que utilizaron este dispositivo han descrito eficacias de separación muy buenas y la configuración utilizada produce un ruido muy pequeño en la detección [121-123]. La derivatización post-capilar no ha sido muy utilizada debido fundamentalmente a la complejidad de los dispositivos empleados y su dificultad para adaptarlos a sistemas comerciales.

I.2.4.2. Reactivos de derivatización fluorescente de proteínas en CE-LIF

A continuación, se describen algunos de los colorantes empleados más frecuentemente a lo largo de las últimas décadas en la derivatización fluorescente de proteínas para su análisis por CE-LIF. La clasificación se ha realizado en función de la naturaleza y reactividad del colorante, es decir, colorantes que reaccionan con algún grupo funcional en la proteína para dar lugar a la derivatización covalente y por otro lado, colorantes que se unen a la proteína en una interacción no-covalente.

I.2.4.2.1. Derivatización covalente

La derivatización covalente es el método más usado para marcar proteínas con sondas fluorescentes. Puede realizarse a través de los grupos amino, de los grupos tiol de los residuos de cisteína o a través de los grupos carboxilo. La más usual es la reacción a través de los grupos amino, fundamentalmente de los grupos amino primarios de los residuos de lisina. Este hecho es debido a que la lisina es uno de los aminoácidos más frecuentemente encontrados en proteínas [118] y el grupo amino es bastante reactivo. La elevada abundancia de grupos amino en proteínas permite aumentar la sensibilidad en CE-LIF. La derivatización a través de los grupos amino de proteínas para su análisis por CE-LIF ha sido ampliamente estudiada y se ha realizado en los tres modos mencionados: pre-capilar, en-capilar y post-capilar.

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es un fluoróforo con el máximo de absorción a 492 nm. Se ha utilizado en muchas ocasiones para el marcado de aminoácidos, pero también se ha aplicado al análisis de proteínas para el caso de la lactoferrina bovina mediante un método de CE basado en interacciones por afinidad [124]. Sin embargo, la mínima concentración de grupos amino que se pueden derivatizar covalentemente con este colorante es de 0,1 μ M [125], por lo que no es válido para el análisis de proteínas minoritarias con este método.

El orto-ftalaldehído (OPA) y el 2,3-naftalenodicarboxialdehído (NDA) son dos colorantes fluorogénicos que reaccionan con grupos amino primarios, en presencia de 2-mercaptoetanol o etanotiol, para dar lugar a un isoindol tio-sustituido altamente fluorescente, con máximos de absorción a 340 y 420 nm, respectivamente. Son solubles y estables en agua y acetonitrilo, respectivamente y ambos reaccionan con proteínas a pH básico con una cinética muy rápida [96]. El NDA, reaccionando con seroalbúmina humana (HSA), alcanza el máximo de reacción en apenas 50 segundos [126]. Por todas estas razones, ambos colorantes han sido empleados para el análisis por CE-LIF de proteínas con derivatización post-capilar, con una sensibilidad muy buena. En ambos casos se obtuvieron LODs del orden de nM para proteínas patrones, con una buena eficacia para la mayoría de ellas [127, 128].

El fluoróforo 6-aminoquinolil-N-hidroxi-succinimidil carbamato (6-AQC) también es muy reactivo frente a aminas primarias y secundarias y se ha empleado para la derivatización en-capilar mediante EMMA de insulina con detección LIF utilizando un láser a 325 nm [129]. Aunque la sensibilidad lograda no es muy elevada, con un LOD próximo a μM , la ventaja es que se demuestra la separación de insulina y dos de sus formas glicosiladas, con buena resolución. Otro problema que plantea el uso de 6-AQC es la formación, mediante hidrólisis, de subproductos fluorescentes.

Otro reactivo fluorogénico es el 3-(2-furoil)quinolin-2-carboxialdehído (FQ), que reacciona también muy eficientemente con grupos amino primario de proteínas en presencia de un nucleófilo como el anión CN^- . Valorando la cinética de reacción frente a α -lactoalbúmina, en tan sólo 10 segundos a temperatura ambiente, se unen una media de 0,5 moléculas de colorante por molécula de proteína y en apenas 10 minutos de reacción, se unen más de tres moléculas [130]. Sin embargo, el FQ así como todos los colorantes mencionados anteriormente que reaccionan con los grupos amino, grupos que potencialmente pueden estar cargados positivamente, transforman estos grupos en neutros tras la derivatización [131], modificando la

carga y el pI de la proteína. Esta modificación produce, debido a la reacción con diferente número de grupos amino de la proteína, la aparición de picos múltiples o ensanchamiento de banda en el análisis por CE-LIF de proteínas. Este problema con la derivatización a través de grupos amino, se ha solucionado, en el caso de reacción con FQ, llevando a cabo las separaciones en presencia de SDS, aunque también funciona con alquilsulfatos más cortos como el pentilsulfato sódico (SPS), añadido al BGE en concentración submicelar [132, 133]. Las moléculas de SDS se unen eficientemente a los diferentes productos de derivatización de una misma proteína e imponen a todos ellos la misma carga, reduciendo las diferencias de movilidad electroforética de los productos de derivatización de la proteína, lo que da lugar a una banda electroforética estrecha. El FQ unido a las proteínas presenta una elevada fluorescencia y puede excitarse con un láser que emita aproximadamente a 488 nm. Se ha empleado en derivatización pre-capilar con un LOD de 10 pM de conalbúmina [132], así como en derivatización en-capilar para la misma proteína con un LOD de 0,3 pM [133]. También se ha empleado en el modo de derivatización en-capilar aplicado al análisis de una única célula de adenocarcinoma de colon humano, con LODs en el intervalo 0,1-0,01 nM [134].

Más recientemente, se han empleado varios reactivos fluorogénicos que se unen también a los grupos amino con una elevada velocidad de reacción. Se trata de colorantes derivados de sales de pirilio. Los productos comercializados son Chromeo™ P465, P503 y P540, con máximos de absorción a 465, 503 y 540 nm respectivamente, cuando están conjugados con la proteína. De manera similar a lo que ocurre con el FQ, estos colorantes reaccionan con la proteína α -lactoalbúmina a temperatura ambiente y en apenas 10 segundos se une una molécula de colorante por molécula de proteína [130]. Otra peculiaridad de estos derivados es que poseen una carga positiva en el oxígeno del anillo aromático, la cual se mantiene en el derivado fluorescente sobre el átomo de nitrógeno del grupo amino de la proteína, un grupo potencialmente cargado positivamente. De esta forma, apenas se modifican las

propiedades electroforéticas de la proteína, únicamente debido al incremento de masa que proporciona la unión de la sonda y ésta suele ser despreciable frente a la masa de la proteína. Estos colorantes se han utilizado para la derivatización pre-capilar de diversas proteínas a concentraciones de ng/ml [135-138].

Otro modo de derivatización covalente de proteínas es la que se produce a través de los grupos tiol de los residuos de cisteína, un modo de derivatización que se ha propuesto como posible estrategia para solucionar el problema de selectividad en la derivatización, es decir, para que cada molécula de proteína produzca un único pico electroforético [107]. En este sentido, la elevada selectividad con que reacciona el grupo iodoacetamida con los tioles es bien conocida [139]. El inconveniente es que los residuos de cisteína son poco abundantes en proteínas con lo que se puede esperar que la sensibilidad sea menor que para los reactivos que reaccionen a través de grupos amino. Los derivados fluoróforos 5-iodoacetamida fluoresceína (5-IAF) y 6-iodoacetamida fluoresceína (6-IAF) se han usado para la derivatización pre-capilar de péptidos y proteínas [140-142].

I.2.4.2.2. Derivatización no-covalente

La derivatización no-covalente parece una alternativa interesante para el análisis por CE-LIF de proteínas, en el sentido de que los colorantes comúnmente empleados para este fin tienen, en principio, condiciones de reacción menos restrictivas que los empleados en la derivatización covalente [96]. En general, este tipo de derivatización minimiza tanto la cantidad de muestra necesaria, como el tiempo de preparación [107]. Estas ventajas se deben a que la unión entre la proteína y el colorante se produce por interacciones hidrófobas, electrostáticas y/o enlaces por puentes de hidrógeno [143], las cuales deberían producirse de forma rápida. Los colorantes normalmente usados poseen un rendimiento cuántico muy bajo cuando están disueltos en el BGE, y experimentan un aumento drástico cuando se unen a la proteína; por esta razón, su aplicación despierta especial interés en la derivatización

en-capilar y post-capilar. Los mecanismos por los cuales las moléculas de colorante aumentan su intensidad de emisión fluorescente cuando se unen de forma no-covalente a la proteína, y por el que sus propiedades fotoquímicas se ven alteradas en presencia de medios diferentes, son difíciles de elucidar ya que dependen en cada caso de la estructura de la molécula orgánica de colorante, así como de la forma en que se produzca su asociación a cada proteína o a las moléculas de disolvente. Lo que parece evidente es que un aumento en la intensidad de emisión fluorescente en los colorantes fluorogénicos, va siempre acompañado de un desplazamiento en las longitudes de onda de excitación y emisión, lo que está relacionado con la estructura y geometría del grupo fluoróforo. Por otro lado, existe una amplia gama de colorantes con máximos de absorción a lo largo del espectro UV-Vis e infrarrojo cercano (NIR).

Los fluoróforos de tipo cianina han sido estudiados para la derivatización covalente de proteínas en análisis por 2D-GE [144]. El desarrollo posterior para la unión no-covalente de colorantes pertenecientes a esta familia, ha dado lugar a varios reactivos utilizados en CE-LIF. El colorante *indocyanine green*, con máximo de absorción a 780 nm, se ha utilizado para la detección de HSA con derivatización pre-capilar, alcanzándose un LOD de 1,4 nM [145]. También se ha empleado el mismo modo de detección para el análisis por CE-LIF de una mezcla de tres proteínas séricas: ribonucleasa A, transferrina y citocromo C, pero en este caso se alcanzó un LOD bastante superior, en torno al μM [146]. Los colorantes tipo *squarylium* son otro tipo de colorantes de la familia de las cianinas que cambian su máximo de emisión en medios diferentes y son menos fotosensibles que el resto de colorantes de la misma familia. Este tipo se ha utilizado en la separación por CE-LIF de cuatro proteínas estándar con derivatización en-capilar y unos LODs del orden nM para BSA y β -lactoglobulina [147]. La merocianina 540 (MC 540) también es muy susceptible de cambiar sus características fotoquímicas en función del medio en el que se encuentre y una característica adicional es su solubilidad en agua. Este último colorante ha sido empleado en la derivatización en-capilar de varias proteínas

de huevo y suero bovino, con un LOD en torno a nM cuando el colorante está presente en el BGE [148].

Otro tipo de colorantes usados en CE-LIF, que también sufren un incremento de la fluorescencia y un desplazamiento en su máximo de emisión hacia longitudes de onda más cortas cuando se unen a proteínas, son los sulfonatos de N-arilaminonaftaleno. Su uso se ha aplicado a la derivatización en-capilar de proteínas de suero lácteo, empleando un láser de He-Cd con emisión a 325 nm, para las cuales se obtuvo un LOD algo inferior al μM excepto para BSA, para la que el LOD fue de 60 nM [149].

Por último, el colorante comercial NanoOrange también se ha aplicado a la derivatización en-capilar [150]. La excitación se realiza a 488 nm con un láser de Ar⁺. Los mismos autores comprueban que el complejo NanoOrange-HSA no es demasiado estable, ya que en apenas 5 minutos, la fluorescencia desciende aproximadamente al 50%. De ahí que el marcado se realice durante la separación, añadiendo el colorante al BGE. De esta forma obtienen un buen LOD de 3,2 nM para la proteína HSA. Otros autores han comprobado que la emisión fluorescente del NanoOrange es más eficaz cuando el BGE contiene SDS a bajas concentraciones, del orden de 0,01%, muy inferiores a la concentración micelar crítica [120]. Por otro lado, también se ha demostrado que el marcado con NanoOrange de BSA, no modifica prácticamente el pI de la proteína [151], lo cual resulta interesante ya que las propiedades electroforéticas de la proteína así derivatizada quedan prácticamente inalteradas.

I.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN MATRICES BIOLÓGICAS PARA SU ANÁLISIS POR CE

La preparación de muestra es, en muchos casos, la etapa limitante en un proceso analítico, al consumir mucho tiempo y, en muchas ocasiones, no poderse automatizar, por lo que requiere una mayor manipulación. La purificación de

proteínas a partir de muestras biológicas es un proceso de preparación de muestra que permite eliminar interferencias y preconcentrar la o las proteínas de interés, mejorando tanto la selectividad como la sensibilidad del proceso analítico. En el caso de matrices biológicas, este proceso es especialmente delicado debido a la complejidad de las muestras como son la sangre, el plasma seminal, la orina o los tejidos, que contienen una cantidad enorme de sales, metabolitos y otros biopolímeros, los cuales podrían interferir posteriormente en la separación electroforética si no son eliminados de forma adecuada. Las interferencias se manifiestan en las separaciones por CE de proteínas como corrientes elevadas en la separación, adsorciones a la pared del capilar o comigración con la proteína de interés [152], lo que provoca pérdida de eficacia en la separación o error sistemático en la cuantificación y, en algunos casos, influyen en el ruido de fondo del detector.

Una de las razones por las que el proceso de preparación de muestra para proteínas consume mucho tiempo es porque normalmente son necesarias varias etapas y técnicas distintas de purificación para obtener la o las proteínas deseadas con un grado de pureza adecuado. Sin embargo, el acoplamiento de las técnicas de purificación a los sistemas de separación por CE, permiten automatizar parcial o totalmente ambos procesos, y reducir el tiempo de análisis, realizando la preparación de muestra incluso en el propio capilar de CE [153-157].

Las técnicas de purificación pueden clasificarse según la selectividad que proporcionan. Así, los métodos físicos como la precipitación, centrifugación, ultrafiltración o diálisis suelen ser poco selectivos porque en las matrices biológicas, las sustancias interferentes están en un número y una diversidad elevadas, por lo que es complicado encontrar unas condiciones que sean suficientemente selectivas, si no para un único analito, al menos para eliminar la mayoría de interferentes, permitiendo el posterior análisis por CE. La centrifugación, por ejemplo, se utiliza para desechar las células en muestras de sangre y obtener así el suero (previa coagulación) o el plasma. La ultrafiltración, por otro lado, se utiliza para eliminar

sales y compuestos de bajo peso molecular o también para separar proteínas de diferentes pesos moleculares, aunque el procedimiento para proteínas no es cuantitativo [158]. Aunque sean poco selectivos, estos métodos suelen emplearse con mucha frecuencia como técnicas complementarias a las de extracción en fase sólida (SPE), a la hora de purificar proteínas en muestras biológicas.

Una técnica que se emplea para la purificación de proteínas es la electroforesis en gel, y en especial la 2D-GE, ya que debido a su elevadísima eficacia, se pueden separar individualmente las proteínas presentes en matrices biológicas complejas, como es el caso de extractos celulares. Después de la separación electroforética, se recortan las zonas de gel de poliacrilamida en las que se encuentran la proteína o proteínas de interés y se extraen con un disolvente adecuado [159, 160].

Una técnica de purificación para proteínas que está adquiriendo cierta importancia en los últimos años es la denominada *Off-Gel*, descrita en 2002 por el grupo de Girault [161]. Esta técnica está diseñada para separar las proteínas en función de su pI y recuperarlas en disolución [162]. La muestra en disolución se coloca en una serie de pocillos, de unos 100 µl cada uno, que se encuentran distribuidos a lo largo de un gel de gradiente de pH inmovilizado (IPG), el cual presenta regiones con diferente pH a lo largo de su longitud. Cuando se aplica el campo eléctrico, al ser un método de IEF, los componentes de la muestra con pI diferente migran hacia la región del gel donde el pH es idéntico a su pI y, posteriormente, pueden ser recuperados en disolución en los diferentes pocillos. El fraccionamiento de proteínas por *Off-Gel* ha sido empleado para el posterior análisis por cromatografía de líquidos en columnas capilares y detección por MS [163-166]. Aunque, en nuestro conocimiento, aparte de un estudio preliminar realizado por nuestro grupo, no existen antecedentes del empleo de *Off-Gel* como técnica de purificación de proteínas para su análisis por CE, sí los hay para el caso de péptidos [167, 168], estableciendo los precedentes para el análisis de proteínas en muestras

biológicas utilizando el acoplamiento entre ambas técnicas, fraccionamiento por *Off-Gel* y separación por CE.

Entre los métodos empleados para la purificación de proteínas, se encuentran también los cromatográficos, que se describirán a continuación en una sección aparte, debido a su amplia utilización para este fin.

I.3.1. Métodos cromatográficos para la purificación de proteínas

La cromatografía de líquidos (LC) como herramienta para la purificación de proteínas a partir de matrices complejas puede realizarse tanto en formato de cartuchos o puntas de pipeta de SPE, como en columnas cromatográficas abiertas, o en formato de cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). En cualquiera de los casos, uno de los inconvenientes de la LC es que, en ocasiones, los disolventes usados para eluir las proteínas pueden ocasionar la desnaturalización de las mismas [153]. La desnaturalización de las proteínas se puede producir cuando se ponen en contacto con disolventes orgánicos, concentraciones salinas muy elevadas o pHs extremos. En la mayoría de los casos la desnaturalización es irreversible y en cualquier caso el proceso de renaturalización es muy diferente para cada proteína. La desnaturalización de las proteínas puede ser problemática tanto desde un punto de vista analítico, como preparativo. Otro inconveniente es que, por lo general, la purificación de las proteínas en cuestión requiere de más de un método cromatográfico, o de la combinación de métodos cromatográficos y no cromatográficos para obtener un grado de pureza óptimo.

Respecto a los diferentes formatos, aunque la SPE se realiza tanto en columnas como en cartuchos y otros dispositivos, el término SPE se asocia generalmente al uso del relleno empaquetado en puntas de pipeta o en cartuchos. Estos se emplean en una extracción pre-capilar, o bien se acoplan en una configuración en-capilar o en línea con el capilar. La SPE en fase inversa, del mismo modo que se emplea para la extracción de péptidos, puede adaptarse también para la

purificación de proteínas [169]. Un ejemplo de SPE en fase inversa fue su empleo para el análisis por CE llevado a cabo sobre derivados de insulina en plasma y orina, con una extracción en-capilar mediante un cartucho de C₈ y elución con acetonitrilo al 40% en tampón fosfato [170]. Otro ejemplo de este último método, fue el análisis realizado de la proteína Bence Jones en orina con purificación en una configuración en línea con CE, mediante un copolímero de estireno y divinilbenceno utilizado como fase sólida y elución con un pequeño volumen de metanol [171]. También existen antecedentes de purificación por SPE en un modo pre-capilar; como ejemplo puede citarse el caso correspondiente a una extracción por intercambio aniónico, en el que las proteínas de tejido cerebral pretratado se purificaron en una columna con relleno de sílice recubierta con polietilenimina lineal y posteriormente se analizaron por CE [172].

En formato de columna cromatográfica, dos modos que se utilizan conjuntamente para la purificación de proteínas [173] son: la cromatografía de intercambio iónico (IEC) y la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). En la IEC, las proteínas se separan en base a su carga eléctrica, en un tampón conteniendo sales, generalmente inorgánicas, utilizando intercambiadores catiónicos o aniónicos dependiendo de la carga que tenga la proteína de interés al pH de trabajo. Los rellenos cromatográficos que se suelen emplear son partículas de poliestireno o sílice aunque también pueden ser columnas monolíticas, en todos los casos unidos a los grupos funcionales correspondientes [174].

La SEC proporciona un mecanismo de separación en el que las proteínas se separan en función de su tamaño molecular, por lo que el relleno empleado suele presentar una amplia distribución en el tamaño de poro. Los parámetros más importantes para la separación son el tamaño de las partículas del relleno y su distribución del tamaño de poro. El material de este relleno suele ser sílice o polímeros hidrófilos [175].

Otro modo cromatográfico utilizado en la purificación de proteínas es la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), en la que las distintas proteínas interaccionan de forma diferente con restos hidrófobos inmovilizados en el relleno cromatográfico. El material sólido usado como relleno puede ser sílice, metacrilato o agarosa y los grupos funcionales unidos suelen ser grupos alquílicos (tales como octil o butil), arílicos (fenil) y etoxialquílicos [176]. Por otro lado, la cromatografía de interacción tiofílica es especialmente útil para la purificación de anticuerpos en diferentes tipos de muestras biológicas, aunque también se ha empleado para otros tipos de proteínas [177]. En este tipo de cromatografía, las proteínas interaccionan con ligandos lineales unidos al relleno que poseen dos átomos de azufre [178]. Cabe indicar también que la LC de interacción hidrófila (HILIC) está adquiriendo cierta importancia en el campo de los estudios proteómicos. El creciente interés que ha adquirido esta técnica a lo largo de los primeros años del presente siglo, aunque fuera descrita ya en 1975 [179], reside en la necesidad de separar compuestos con elevada polaridad, difícil de realizar con otras técnicas de separación, y la creciente complejidad de las muestras objeto de estudio [180]. El modo de separación en HILIC se basa en una fase estacionaria hidrófila y una fase móvil de disolventes orgánicos miscibles con agua. El relleno de sílice es uno de los más empleados en este tipo de cromatografía. Existe una gran variedad de grupos funcionales como aminas, amidas, dioles o sulfobetaínas empleados en la fase estacionaria como grupos polares [181]. La HILIC se ha empleado, por ejemplo, para la purificación de subtipos de la histona H1 y su posterior análisis por CE [182].

Por último, también se puede mencionar la cromatografía de afinidad, que se describe ampliamente en la siguiente sección.

I.3.2. Métodos de purificación de proteínas basados en interacciones de afinidad

Las interacciones por afinidad entre proteínas y diferentes ligandos se han empleado ampliamente para purificar proteínas de matrices biológicas. Los ligandos

pueden ser de naturaleza diversa como anticuerpos, aptámeros, lectinas, colorantes o iones metálicos.

La purificación por afinidad se puede realizar en diversos medios, por ejemplo en disolución [183] o en diferentes soportes, como partículas magnéticas derivatizadas con algún ligando [184] o partículas de sílice o agarosa unidas a ligandos para conformar un soporte cromatográfico [185, 186], que se emplea empaquetado en cartuchos, puntas de pipeta o columnas. En general, los métodos cromatográficos son los más usados en purificación de proteínas por afinidad, aunque cada vez está más generalizado el empleo de partículas magnéticas.

Las lectinas son especialmente útiles para la extracción de glicoproteínas, ya que interaccionan de forma específica con los diferentes glicanos presentes en la proteína. Las lectinas conforman una familia de proteínas muy numerosa, extraídas de diversas fuentes de origen vegetal y animal, encontrándose entre las más empleadas la *Concanavalina A* y la *Aleuria Aurantia*. Además de las posibilidades derivadas del elevado número de lectinas existentes, su empleo puede llevarse a cabo de maneras muy diversas [186], tanto en lo que se refiere al empleo de una única especie de lectina o varias combinadas en un único proceso de purificación, como el modo en que se utilizan unidas a diferentes soportes de forma covalente o no-covalente.

Otro tipo de interacción por afinidad es el que tiene lugar entre iones metálicos y determinados aminoácidos o grupos funcionales de las proteínas, como por ejemplo la interacción entre el Fe^{2+} y la hemoglobina. Este tipo de interacciones también es interesante para la purificación de proteínas ya que, aunque sea menos específica que las basadas en reconocimientos biológicos, como en el caso de lectinas o anticuerpos, la adsorción y elución de las proteínas es más versátil debido a que la interacción se produce por mecanismos menos complejos que los anteriores [153]. La cromatografía de afinidad con iones metálicos (IMAC), además de para la purificación de proteínas, se ha empleado también para otras aplicaciones como

estudio de plegamiento de proteínas o para la preparación de biosensores [185]. Para este modo de cromatografía, se han comercializado diferentes rellenos, tales como celulosa, agarosa, sílice o poliestireno, sobre los cuales se enlaza el agente quelante que finalmente unirá el ion metálico.

El empleo de anticuerpos como ligandos unidos a un relleno cromatográfico proporciona generalmente una buena selectividad en la purificación de antígenos y ha dado lugar a las técnicas llamadas de cromatografía de inmutafinidad. En esta técnica, la selectividad viene proporcionada por la especificidad del inmunorreconocimiento entre el anticuerpo (Ab, abreviatura del término inglés *antibody*) y la proteína que actúa como antígeno (Ag, *antigen*), es decir, como sustancia que es reconocida por un Ab. Los Abs son proteínas, concretamente inmunoglobulinas, de elevado peso molecular \geq (150.000 Da) que, en el cuerpo humano, se sintetizan en un número estimado de tipos diferentes entre 10 y 100 millones, cada uno de los cuales es capaz de unirse a un Ag determinado [187]. Están formados por cuatro cadenas polipeptídicas, dos más pesadas idénticas y dos más ligeras también idénticas que se encuentran unidas por puentes disulfuro, adoptando una estructura de Y. La parte inferior de la estructura de Y se denomina región F_c y tiene una elevada concordancia entre los distintos tipos de Ab. Las partes superiores de la estructura de Y se denominan regiones F_{ab} y son idénticas para las moléculas de Ab de un mismo tipo, pero muy diferentes entre Abs diferentes, ya que en ellas se encuentran las regiones F_v o variables, lo que permite la especificidad de la unión con cada Ag. Esta interacción Ag-Ab es de tipo no-covalente debida a puentes de hidrógeno, atracciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals y uniones hidrófobas. La unión se produce mediante una zona de unos cuantos aminoácidos en el Ag, llamada epítopo, y una región en el Ab, llamada paratopo. La especificidad de la unión se debe a la elevada complementariedad existente entre epítopo y paratopo, ya que un elevado número de fuerzas actúan al mismo tiempo. De este modo, las interacciones Ag-Ab proporcionan unas constantes de afinidad elevadas, de hasta

10^{12} M^{-1} [188]. La especificidad de la interacción es tal que en algunos casos se puede extraer la proteína de interés en muestras tan complejas como plasma o suero sanguíneo, realizando únicamente como tratamiento previo al inmunorreconocimiento una dilución de la muestra [189]. Por tanto, las técnicas de cromatografía de inmutioafinidad son muy útiles para obtener una proteína purificada a partir de una muestra biológica, con un grado de pureza superior a cualquier otro método de purificación, tal que normalmente no es necesario ningún paso cromatográfico adicional.

Los tres tipos de Ab que se pueden emplear en inmutioafinidad, son monoclonales, policlonales y recombinantes, siendo los más usados los dos primeros. Los monoclonales se obtienen por lo que se denomina la técnica del hibridoma, en la cual, se realiza la fusión de una línea celular de mieloma con células de bazo extraídas de un animal, el cual ha sido inmunizado previamente con el Ag correspondiente. Los Ab policlonales se obtienen de múltiples líneas celulares como resultado de la inmunización de un animal con el antígeno específico. Por último, los Ab recombinantes se obtienen por ingeniería genética *in vitro*. Debido a su obtención desde una única línea celular, los Ab monoclonales son más específicos ya que reconocen un único epítipo del Ag y se producen de manera reproducible, aunque son difíciles de obtener y por lo tanto son caros. Por el contrario, los policlonales son más fáciles de obtener pero también de forma menos reproducible y reconocen varios epítipos de una misma proteína, lo cual puede ser una ventaja o una desventaja según el Ag a purificar y la aplicación.

Al hablar de purificación por inmutioafinidad, se hace a menudo mención a las técnicas de inmunoprecipitación. Originalmente, la inmunoprecipitación se refiere a la formación de complejos insolubles Ag-Ab, como los correspondientes a las líneas de precipitado formados en las técnicas de análisis por inmunodifusión. Aunque la formación de complejos insolubles se ha empleado a veces para la purificación de proteínas, el término inmunoprecipitación se ha extendido, de forma

no muy correcta, en muchas ocasiones a la purificación de proteínas por formación de complejos Ag-Ab sin tener en cuenta su solubilidad.

Los formatos empleados para purificación de proteínas por inmuoafinidad son, en general, los mismos mencionados para afinidad en general, en los que el Ab se une a partículas magnéticas o rellenos cromatográficos, en este caso empaquetados en cartuchos, puntas de pipeta o columnas cromatográficas. En algunas ocasiones se ha realizado la purificación empleando Abs inmovilizados en placas de tipo ELISA [190]. La cromatografía de inmuoafinidad (IAC, acrónimo del inglés *ImmunoAffinity Chromatography*), también llamada inmunocromatografía, se describe en detalle a continuación, ya que esta técnica constituye una parte de esta Tesis.

Al hablar de purificación mediante afinidad, se describe generalmente la purificación de Ags; sin embargo, mediante el mismo mecanismo pueden purificarse los Abs de interés en una muestra empleando como ligandos los Ags correspondientes.

La IAC, y en especial la realizada en sistemas de HPLC, combina la elevada especificidad del inmunorreconocimiento con las ventajas de los sistemas de flujo, como son rapidez, control del flujo, posibilidad de concentración y facilidad de automatización [191, 192]. La primera aplicación de la técnica de IAC se atribuye a un trabajo realizado en 1951 por Campbell y col., en el que se unió albumina a un relleno cromatográfico de *p*-aminobencilcelulosa, para la purificación de Abs [193].

Para la purificación de proteínas mediante IAC se emplean Abs unidos al soporte cromatográfico, que posteriormente se empaqueta en la columna cromatográfica. Un aspecto a tener en cuenta en relación con el soporte cromatográfico es su tamaño de poro. Un tamaño pequeño de poro aumenta el área superficial, aunque si es demasiado pequeño, puede dificultar o impedir el acceso e inmovilización del Ag. Por esta razón, parece que los tamaños de poro óptimos están

en el intervalo 300-500 Å, que corresponde a un tamaño de entre 3 a 5 veces el diámetro de un Ab [194].

Los materiales que se han usado tradicionalmente como soporte son polisacáridos como agarosa o celulosa, o polímeros orgánicos, como poliacrilamida o polietersulfona, dado su bajo precio. Sin embargo, estos materiales tienen el principal inconveniente de que no son suficientemente estables mecánicamente a las presiones con las que se trabaja en aplicaciones en las que se requiere hacer pasar la fase móvil a elevada velocidad para reducir el tiempo de purificación, como ocurre en sistemas de HPLC [192].

Entre los materiales que se utilizan en estas aplicaciones en modo de HPLC y que proporcionan una buena estabilidad mecánica además de una elevada eficacia se encuentran las partículas de sílice, vidrio poroso o polimetacrilato. Existen numerosos procedimientos por los que estos materiales pueden derivatizarse con grupos funcionales o ligandos que permitan la unión posterior no-covalente o covalente del Ab al soporte [195].

Entre los métodos de unión no-covalente más empleados están aquéllos basados en el empleo de soportes modificados con proteína A o proteína G. Estos ligandos se unen con elevada avidez a la zona F_c de los Abs, permitiendo así la inmovilización de los mismos con la zona F_v expuesta hacia el exterior, lo que facilita la interacción con el Ag. Sin embargo, los agentes empleados para eluir el Ag, además de romper las interacciones de éste con el Ab, pueden romper las uniones Ab-proteína G (o proteína A), impurificando de este modo la muestra e inutilizando la inmunocolumna para futuras aplicaciones [196, 197]. La solución empleada en múltiples ocasiones consiste en realizar un entrecruzamiento entre la proteína G (o proteína A) y el Ab inmovilizado, de modo que la unión pasa a ser covalente.

Los procedimientos más utilizados para la inmovilización del Ab en el relleno son los que llevan a cabo la unión a través de un enlace covalente, y entre ellos el que se realiza por los grupos amino del Ab. Esta unión puede producirse debido a la

activación del soporte cromatográfico por numerosos compuestos tales como N,N'-carbonildiimidazol, N-hidroxisuccinimida, bromuro de cianógeno, cloruro de tresilo/cloruro de tosilo o bien empleando el soporte cromatográfico derivatizado con grupos reactivos como epóxido o aldehído [196-198]. Una desventaja de este procedimiento es que la unión del Ab a través de sus grupos amino puede provocar un descenso en la eficacia de unión con el Ag, bien porque posea grupos amino en el sitio de unión con éste, o bien porque la unión del Ab al soporte se produzca en una orientación tal que genere un impedimento estérico a la unión posterior del Ag. Una forma de producir una unión orientada del Ab en el soporte es la reacción a través de grupos tiol libres de los fragmentos F_{ab} , que se unen covalentemente a grupos funcionales, introducidos en el soporte por los métodos de divinilsulfona, epóxido, iodoacetilo/bromoacetilo, maleimida o cloruro de tresilo/cloruro de tosilo [196-198]. Otro método consiste en la unión del Ab a través de sus glicanos presentes en la región F_c , cuyos grupos hidroxilo son oxidados en condiciones suaves a grupos aldehído, que reaccionan finalmente con grupos hidrazida introducidos en el soporte cromatográfico [199]; de este modo, la orientación de los Abs es similar a la descrita para la unión a través de proteína G o proteína A.

La unión del Ab al relleno cromatográfico puede realizarse previamente a su empaquetamiento en la columna cromatográfica, o bien puede derivatizarse el relleno ya empaquetado, siendo más habitual el primer procedimiento. Una vez fabricada la columna de IAC, para realizar la purificación del Ag de interés, la muestra se introduce en la columna empleando como fase móvil una disolución de unión, que suele ser un tampón fosfato salino (PBS) a pH próximo a 7 para tratar de emular las condiciones fisiológicas. En la Figura I.5 se puede observar un esquema de un procedimiento de IAC. Cuando la muestra pasa por la columna, el Ag es reconocido por el Ab inmovilizado y lo captura, mientras que en ausencia de interacciones no específicas, el resto de los componentes de la muestra salen de la columna sin retenerse.

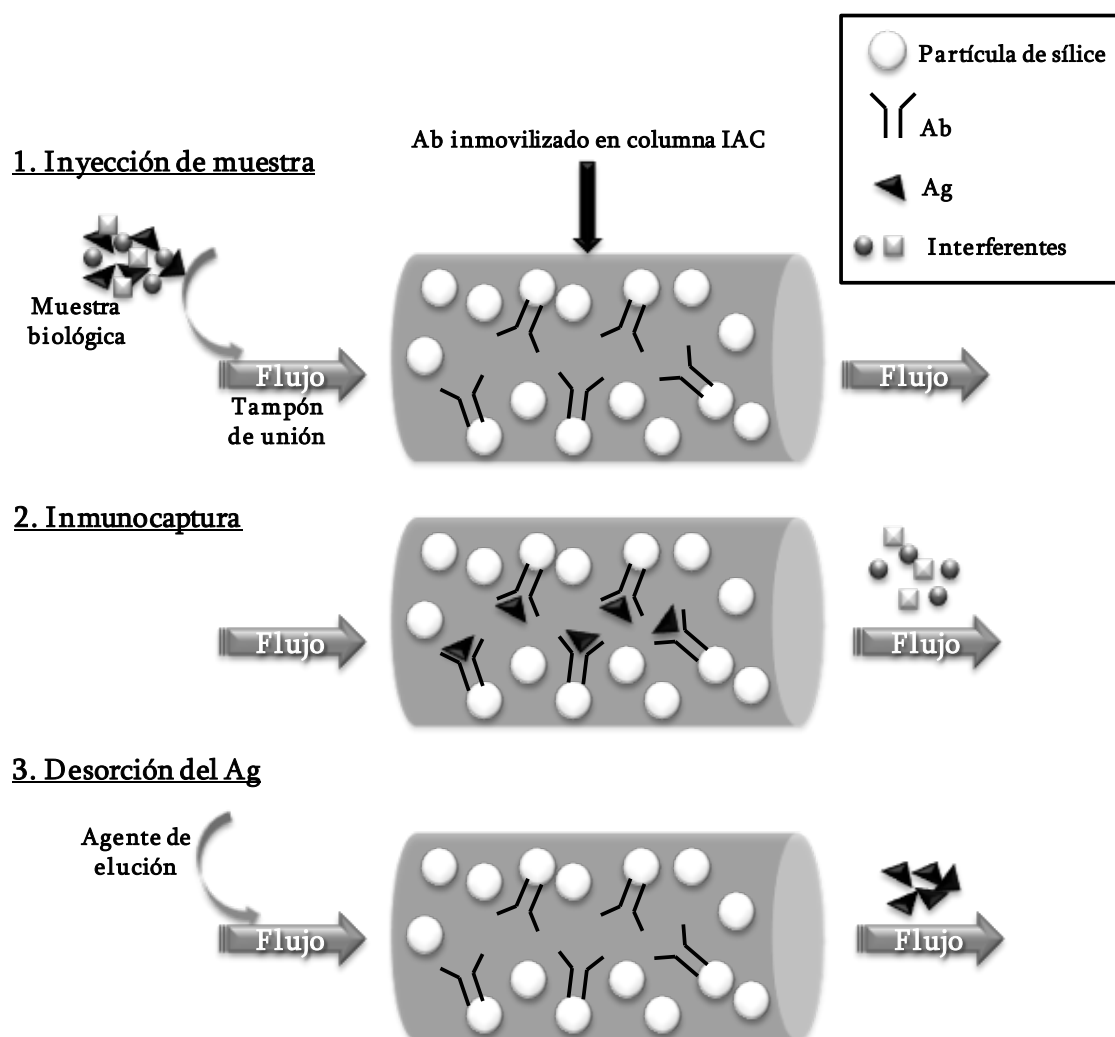


Figura I.5. Esquema de la purificación de un Ag a partir de una muestra biológica mediante IAC.

Las interacciones no específicas que puedan producirse durante el proceso cromatográfico son de suma importancia ya que van a determinar la pureza de la proteína de interés, lo que condicionará posteriormente su separación por CE y detección. Por una parte, para evitar uniones no específicas de la proteína en estudio a las partículas de soporte, es necesario unir a éstas una proporción elevada de moléculas de Ab, así como bloquear los puntos activos del relleno que pudieran quedar libres tras la reacción de acoplamiento del Ab. Por otro lado, hay que tener en cuenta que, además de con el soporte cromatográfico, las interacciones no específicas pueden producirse con el propio Ab o con el resto de elementos del

sistema cromatográfico, como el tubo de la columna, tubos de unión entre elementos, o válvulas de inyección. Por ello, es recomendable elegir materiales biocompatibles y, en caso necesario, emplear aditivos en la fase móvil que eviten o minimicen esas interacciones. Por otro lado, si se producen esas uniones no específicas por parte de otras proteínas presentes en la muestra biológica, éstas pueden ser eliminadas, en ocasiones, mediante una etapa de lavado previa a la elución, empleando soluciones adecuadas, por ejemplo soluciones salinas de elevada concentración [200], que no alteren la interacción específica Ag-Ab.

Una vez realizada la inmunocaptura y, si fuese necesario, las etapas de lavado, el Ag se extrae de la columna mediante la introducción de un tampón de elución que favorezca la disociación del complejo Ag-Ab. Esta etapa tiene también gran importancia, ya que de ella dependerá la extracción óptima del Ag, en términos de recuperación, pureza y estabilidad, y la regeneración adecuada de la columna para purificaciones posteriores. Los agentes de elución que se suelen emplear son sustancias caotrópicas o un tampón con pH diferente al del tampón de unión, aunque también se pueden utilizar agentes desnaturizantes o disolventes orgánicos. Algunos de los agentes caotrópicos utilizados, a concentraciones del orden de 1-8 M, son: el ion tiocianato, el ion cloruro o el ion perclorato [201]. Por otro lado, los cambios bruscos de pH para la elución son muy eficientes ya que pueden producir la desnaturización parcial del Ag o del Ab, favoreciendo la disociación. Sin embargo, este tipo de elución es válida siempre y cuando la desnaturización sea reversible, para la posterior reutilización de la inmunocolumna y también en los casos en que sea necesario conservar la estructura nativa de la proteína que se quiere purificar. Los soportes cromatográficos de sílice utilizados en aplicaciones de HPLC no son estables a pH superior a 8-9, por lo que es preferible intentar la elución a pH ácido, entre 2-3, que en determinadas ocasiones ha demostrado ser un medio adecuado para la elución [189]. Sin embargo, al elegir las condiciones de elución hay que tener

presente que las condiciones óptimas de disociación de complejos Ag-Ab son específicas para cada par Ag-Ab.

Una vez se ha eluído el Ag, la columna se regenera haciendo pasar un volumen adecuado de tampón de unión antes de inyectar la muestra siguiente. El tiempo de regeneración de la columna, es decir, tiempo que tarda el Ab en recuperar la estructura original, depende del agente de elución empleado. En este sentido, hay trabajos en los que se demuestra que las columnas de IAC pueden regenerarse adecuadamente bajo cambios bruscos de pH, utilizados para la elución del Ag, pasando de 7,0-7,5 en las condiciones de unión, a 2,5-3,0 en las condiciones de elución [187, 189, 202]. Sin embargo, cuando se utilizan disolventes orgánicos en el agente de elución la concentración de éstos es generalmente baja ya que, incluso si la desnaturalización del Ab no es irreversible, la regeneración de la columna puede llevar varios días [203].

I.4. REFERENCIAS

- [1] Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., Forman, D., Bray, F., *Eur. J. Cancer* 2013, **49**, 1374-1403.
- [2] Lilja, H., *Urology* 2003, **62**, 27-33.
- [3] Sciarra, A., Mariotti, G., Salciccia, S., Gomez, A. A., Monti, S., Toscano, V., Di Silverio, F., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2008, **108**, 254-260.
- [4] Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y. P., Xu, J. Q., Thun, M. J., *CA Cancer J. Clin.* 2009, **59**, 225-249.
- [5] Atkinson, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F., Oates, J. A., Peck, C. C., Schooley, R. T., Spilker, B. A., Woodcock, J., Zeger, S. L., *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001, **69**, 89-95.
- [6] Issaq, H. J., Waybright, T. J., Veenstra, T. D., *Electrophoresis* 2011, **32**, 967-975.
- [7] Yang, Z., Sweedler, J. V., *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, **406**, 4013-4031.
- [8] Ludwig, J. A., Weinstein, J. N., *Nat. Rev. Cancer* 2005, **5**, 845-856.
- [9] Sahab, Z. J., Semaan, S. M., Sang, Q.-X. A., *Biomark. Insights* 2007, **2**, 21-43.
- [10] Srivastava, S., Kramer, B. S., *Lab. Invest.* 2000, **80**, 1147-1148.
- [11] Pepe, M. S., Etzioni, R., Feng, Z. D., Potter, J. D., Thompson, M. L., Thornquist, M., Winget, M., Yasui, Y., *J. Natl. Cancer Inst.* 2001, **93**, 1054-1061.
- [12] Gutman, A. B., Gutman, E. B., *J. Clin. Invest.* 1938, **17**, 473-478.
- [13] Fuzery, A. K., Levin, J., Chan, M. M., Chan, D. W., *Clin. Proteomics* 2013, **10**, 13.
- [14] Beckett, M. L., Cazares, L. H., Vlahou, A., Schellhammer, P. F., Wright Jr., G. L., *Clin. Cancer Res.* 1999, **5**, 4034-4040.
- [15] Rubin, M. A., Zhou, M., Dhanasekaran, S. M., Varambally, S., Barrette, T. R., Sanda, M. G., Pienta, K. J., Ghosh, D., Chinnaiyan, A. M., *JAMA* 2002, **287**, 1662-1670.
- [16] Rogers, C. G., Yan, G., Zha, S., Gonzalgo, M. L., Isaacs, W. B., Luo, J., De Marzo, A. M., Nelson, W. G., Pavlovich, C. P., *J. Urol.* 2004, **172**, 1501-1503.

- [17] Bracarda, S., de Cobelli, O., Greco, C., Prayer-Galetti, T., Valdagni, R., Gatta, G., de Braud, F., Bartsch, G., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2005, *56*, 379-396.
- [18] Tabares, G., Radcliffe, C. M., Barrabes, S., Ramirez, M., Aleixandre, R. N., Hoesel, W., Dwek, R. A., Rudd, P. M., Peracaula, R., de Llorens, R., *Glycobiology* 2006, *16*, 132-145.
- [19] Diamandis, E. P., *Trends Endocrinol. Metab.* 1998, *9*, 310-316.
- [20] Clements, J. A., Willemsen, N. M., Myers, S. A., Dong, Y., *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2004, *41*, 265-312.
- [21] Lilja, H., Oldbring, J., Rannevik, G., Laurell, C. B., *J. Clin. Invest.* 1987, *80*, 281-285.
- [22] Balk, S. P., Ko, Y. J., Buble, G. J., *J. Clin. Oncol.* 2003, *21*, 383-391.
- [23] Mikolajczyk, S. D., Marks, L. S., Partin, A. W., Rittenhouse, H. G., *Urology* 2002, *59*, 797-802.
- [24] Catalona, W. J., Smith, D. S., Ratliff, T. L., Dodds, K. M., Coplen, D. E., Yuan, J. J., Petros, J. A., Andriole, G. L., *N. Engl. J. Med.* 1991, *324*, 1156-1161.
- [25] Brawer, M. K., *CA Cancer J. Clin.* 1995, *45*, 148-164.
- [26] Brawer, M. K., *CA Cancer J. Clin.* 1999, *49*, 264-281.
- [27] Catalona, W. J., Richie, J. P., Ahmann, F. R., Hudson, M. A., Scardino, P. T., Flanigan, R. C., Dekernion, J. B., Ratliff, T. L., Kavoussi, L. R., Dalkin, B. L., Waters, W. B., Macfarlane, M. T., Southwick, P. C., *J. Urol.* 1994, *151*, 1283-1290.
- [28] Laguna, P., Alivizatos, G., *Curr. Opin. Urol.* 2000, *10*, 3-8.
- [29] Thompson, I. M., Pauler, D. K., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Parnes, H. L., Minasian, L. M., Ford, L. G., Lippman, S. M., Crawford, E. D., Crowley, J. J., Coltman, C. A., *N. Engl. J. Med.* 2004, *350*, 2239-2246.
- [30] Etzioni, R., Gulati, R., Cooperberg, M. R., Penson, D. M., Weiss, N. S., Thompson, I. M., *Med. Care* 2013, *51*, 295-300.
- [31] Hayes, J. H., Barry, M. J., *JAMA* 2014, *311*, 1143-1149.

- [32] Schroeder, F. H., Hugosson, J., Roobol, M. J., Tammela, T. L. J., Ciatto, S., Nelen, V., Kwiatkowski, M., Lujan, M., Lilja, H., Zappa, M., Denis, L. J., Recker, F., Berenguer, A., Maattanen, L., Bangma, C. H., Aus, G., Villers, A., Rebillard, X., van der Kwast, T., Blijenberg, B. G., Moss, S. M., de Koning, H. J., Auvinen, A., *N. Engl. J. Med.* 2009, *360*, 1320-1328.
- [33] Roobol, M. J., Kerkhof, M., Schroeder, F. H., Cuzick, J., Sasieni, P., Hakama, M., Stenman, U. H., Ciatto, S., Nelen, V., Kwiatkowski, M., Lujan, M., Lilja, H., Zappa, M., Denis, L., Recker, F., Berenguer, A., Ruutu, M., Kujala, P., Bangma, C. H., Aus, G., Tammela, T. L. J., Villers, A., Rebillard, X., Moss, S. M., de Koning, H. J., Hugosson, J., Auvinen, A., *Eur. Urol.* 2009, *56*, 584-591.
- [34] Schröder, F. H., Hugosson, J., Roobol, M. J., Tammela, T. L. J., Ciatto, S., Nelen, V., Kwiatkowski, M., Lujan, M., Lilja, H., Zappa, M., Denis, L. J., Recker, F., Páez, A., Määttänen, L., Bangma, C. H., Aus, G., Carlsson, S., Villers, A., Rebillard, X., van der Kwast, T., Kujala, P. M., Blijenberg, B. G., Stenman, U.-H., Huber, A., Taari, K., Hakama, M., Moss, S. M., de Koning, H. J., Auvinen, A., *N. Engl. J. Med.* 2012, *366*, 981-990.
- [35] Andriole, G. L., Grubb, R. L., Buys, S. S., Chia, D., Church, T. R., Fouad, M. N., Gelmann, E. P., Kvale, P. A., Reding, D. J., Weissfeld, J. L., Yokochi, L. A., Crawford, E. D., O'Brien, B., Clapp, J. D., Rathmell, J. M., Riley, T. L., Hayes, R. B., Kramer, B. S., Izmirlian, G., Miller, A. B., Pinsky, P. F., Prorok, P. C., Gohagan, J. K., Berg, C. D., *N. Engl. J. Med.* 2009, *360*, 1310-1319.
- [36] Andriole, G. L., Crawford, E. D., Grubb, R. L., Buys, S. S., Chia, D., Church, T. R., Fouad, M. N., Isaacs, C., Kvale, P. A., Reding, D. J., Weissfeld, J. L., Yokochi, L. A., O'Brien, B., Ragard, L. R., Clapp, J. D., Rathmell, J. M., Riley, T. L., Hsing, A. W., Izmirlian, G., Pinsky, P. F., Kramer, B. S., Miller, A. B., Gohagan, J. K., Prorok, P. C., *J. Natl. Cancer Inst.* 2012, *104*, 125-132.
- [37] Aslani, A., Minnillo, B. J., Johnson, B., Cherullo, E. E., Ponsky, L. E., Abouassaly, R., *J. Urol.* 2014, *191*, 1737-1742.

- [38] Luderer, A. A., Chen, Y.-T., Soriano, T. F., Kramp, W. J., Carlson, G., Cuny, C., Sharp, T., Smith, W., Petteway, J., Brawer, M. K., Thiel, R., *Urology* 1995, **46**, 187-194.
- [39] Catalona, W. J., Southwick, P. C., Slawin, K. M., Partin, A. W., Brawer, M. K., Flanigan, R. C., Patel, A., Richie, J. P., Walsh, P. C., Scardino, P. T., Lange, P. H., Gasior, G. H., Loveland, K. G., Bray, K. R., *Urology* 2000, **56**, 255-260.
- [40] Smith, D. S., Catalona, W. J., *J. Urol.* 1994, **152**, 1163-1167.
- [41] Brawer, M. K., Meyer, G. E., Letran, J. L., Bankson, D. D., Morris, D. L., Yeung, K. K., Allard, W. J., *Urology* 1998, **52**, 372-378.
- [42] Linton, H. J., Marks, L. S., Millar, L. S., Knott, C. L., Rittenhouse, H. G., Mikolajczyk, S. D., *Clin. Chem.* 2003, **49**, 253-259.
- [43] Mikolajczyk, S. D., Catalona, W. J., Evans, C. L., Linton, H. J., Millar, L. S., Marker, K. M., Katir, D., Amirkhan, A., Rittenhouse, H. G., *Clin. Chem.* 2004, **50**, 1017-1025.
- [44] Sokoll, L. J., Wang, Y., Feng, Z., Kagan, J., Partin, A. W., Sanda, M. G., Thompson, I. M., Chan, D. W., *J. Urol.* 2008, **180**, 539-543.
- [45] Peracaula, R., Barrabes, S., Sarrats, A., Rudd, P. M., de Llorens, R., *Dis. Markers* 2008, **25**, 207-218.
- [46] Belanger, A., van Halbeek, H., Graves, H. C. B., Grandbois, K., Stamey, T. A., Huang, L. H., Poppe, I., Labrie, F., *Prostate* 1995, **27**, 187-197.
- [47] Okada, T., Sato, Y., Kobayashi, N., Sumida, K., Satomura, S., Matsuura, S., Takasaki, M., Endo, T., *Biochim. Biophys. Acta* 2001, **1525**, 149-160.
- [48] Peracaula, R., Tabares, G., Royle, L., Harvey, D. J., Dwek, R. A., Rudd, P. M., de Llorens, R., *Glycobiology* 2003, **13**, 457-470.
- [49] Ohyama, C., Hosono, M., Nitta, K., Oh-eda, M., Yoshikawa, K., Habuchi, T., Arai, Y., Fukuda, M., *Glycobiology* 2004, **14**, 671-679.
- [50] Sarrats, A., Saldova, R., Comet, J., O'Donoghue, N., de Llorens, R., Rudd, P. M., Peracaula, R., *OMICS* 2010, **14**, 465-474.

- [51] Charrier, J. P., Tournel, C., Michel, S., Dalbon, P., Jolivet, M., *Electrophoresis* 1999, *20*, 1075-1081.
- [52] Jung, K., Reiche, J., Boehme, A., Stephan, C., Loening, S. A., Schnorr, D., Hoesel, W., Sinha, P., *Clin. Chem.* 2004, *50*, 2292-2301.
- [53] Sarrats, A., Comet, J., Tabares, G., Ramirez, M., Aleixandre, R. N., de Llorens, R., Peracaula, R., *Prostate* 2010, *70*, 1-9.
- [54] Peter, J., Unverzagt, C., Hoesel, W., *Clin. Chem.* 2000, *46*, 474-482.
- [55] Tiselius, A., *Trans. Faraday Soc.* 1937, *33*, 524-530.
- [56] Landers, J. P., en: Landers, J. P. (Ed.), *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, 3ª edición, CRC Press Inc., Boca Raton (Florida) 2008, pp. 3-74.
- [57] Consden, R., Gordon, A. H., Martin, A. J. P., *Biochem. J.* 1944, *38*, 224-232.
- [58] Wieland, T., Fischer, E., *Naturwissenschaften* 1948, *35*, 29-29.
- [59] Grabar, P., Williams, C. A., *Biochim. Biophys. Acta* 1953, *10*, 193-194.
- [60] Kolin, A., *J. Chem. Phys.* 1954, *22*, 1628-1629.
- [61] Hjerten, S., *Arkiv Kemi* 1958, *13*, 151-152.
- [62] Raymond, S., Weintraub, L., *Science* 1959, *130*, 711-711.
- [63] Svensson, H., *Acta Chem. Scand.* 1961, *15*, 325-341.
- [64] Svensson, H., *Acta Chem. Scand.* 1962, *16*, 456-466.
- [65] Vesterberg, O., Svensson, H., *Acta Chem. Scand.* 1966, *20*, 820-834.
- [66] Vesterberg, O., Wadström, T., Vesterberg, K., Svensson, H., Malmgren, B., *Biochim. Biophys. Acta* 1967, *133*, 435-445.
- [67] Vesterberg, O., *Acta Chem. Scand.* 1969, *23*, 2653-2666.
- [68] Shapiro, A. L., Viñuela, E., Maizel Jr, J. V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967, *28*, 815-820.
- [69] Hjertén, S., *Chromatogr. Rev.* 1967, *9*, 122-219.
- [70] O'Farrell, P. H., *J. Biol. Chem.* 1975, *250*, 4007-4021.
- [71] Virtanen, R., *Acta Polytechnica Scand.* 1974, 1-67.

- [72] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *Anal. Chem.* 1981, *53*, 1298-1302.
- [73] Elbashir, A. A., Saad, B., Aboul-Enein, H. Y., *Curr. Pharm. Anal.* 2010, *6*, 246-255.
- [74] Guo, L. H., Qiu, B., Xiao, X. Y., Chen, G. N., *J. Food Sci. Biotechnol.* 2009, *18*, 823-832.
- [75] Caslavská, J., Thormann, W., *J. Chromatogr. A* 2011, *1218*, 588-601.
- [76] Tseng, H. M., Li, Y., Barrett, D. A., *Bioanalysis* 2010, *2*, 1641-1653.
- [77] Aebersold, R., Morrison, H. D., *J. Chromatogr.* 1990, *516*, 79-88.
- [78] Hempe, J. M., en: Landers, J. P. (Ed.), *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, 3ª edición, CRC Press Inc., Boca Raton (Florida) 2008, pp. 75-107.
- [79] El Rassi, Z., *Electrophoresis* 2010, *31*, 174-191.
- [80] Berkowitz, S. A., Zhong, H. J., Berardino, M., Sosic, Z., Siemiatkoski, J., Krull, I. S., Mhatre, R., *J. Chromatogr. A* 2005, *1079*, 254-265.
- [81] Verzola, B., Gelfi, C., Righetti, P. G., *J. Chromatogr. A* 2000, *868*, 85-99.
- [82] Cohen, A. S., Karger, B. L., *J. Chromatogr.* 1987, *397*, 409-417.
- [83] Guttman, A., *J. Chromatogr. Sci.* 2003, *41*, 449-459.
- [84] Cifuentes, A., Moreno-Arribas, M. V., de Frutos, M., Diez-Masa, J. C., *J. Chromatogr. A* 1998, *830*, 453-463.
- [85] Lacunza, I., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2007, *28*, 1204-1213.
- [86] Girard, M., Lacunza, I., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., en: Landers, J. P. (Ed.), *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, 3ª edición, CRC Press Inc., Boca Raton (Florida) 2008, pp. 631-706.
- [87] Ongay, S., Puerta, A., Diez-Masa, J. C., Bergquist, J., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2009, *30*, 1198-1205.
- [88] Riekkola, M. L., Jonsson, J. A., Smith, R. M., *Pure Appl. Chem.* 2004, *76*, 443-451.

- [89] Breadmore, M. C., Shallan, A. I., Rabanes, H. R., Gstoettenmayr, D., Abdul Keyon, A. S., Gaspar, A., Dawod, M., Quirino, J. P., *Electrophoresis* 2013, **34**, 29-54.
- [90] Schulze, P., Belder, D., *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, **393**, 515-525.
- [91] Heiger, D., *High performance capillary electrophoresis. An introduction*, Agilent Technologies©, Alemania 2000, pp. 96-109.
- [92] Thibault, P., Dovichi, N. J., en: Camilleri, P. (Ed.), *Capillary Electrophoresis. Theory and Practice*, CRC Press Inc., Boca Raton (Florida) 1998, pp. 23-90.
- [93] Gassmann, E., Kuo, J. E., Zare, R. N., *Science* 1985, **230**, 813-814.
- [94] Chiu, T. C., Tu, W. C., Chang, H. T., *Electrophoresis* 2008, **29**, 433-440.
- [95] Rodat-Boutonnet, A., Naccache, P., Morin, A., Fabre, J., Feurer, B., Couderc, F., *Electrophoresis* 2012, **33**, 1709-1714.
- [96] Garcia-Campana, A. M., Taverna, M., Fabre, H., *Electrophoresis* 2007, **28**, 208-232.
- [97] Karlinsey, J. M., Landers, J. P., en: Landers, J. P. (Ed.), *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, 3ª edición, CRC Press Inc., Boca Raton (Florida) 2008, pp. 1253-1276.
- [98] Gooijer, C., Kok, S. J., Ariese, F., *Analisis* 2000, **28**, 679-685.
- [99] Yeung, E. S., Wang, P. G., Li, W. N., Giese, R. W., *J. Chromatogr.* 1992, **608**, 73-77.
- [100] Hernandez, L., Escalona, J., Joshi, N., Guzman, N., *J. Chromatogr.* 1991, **559**, 183-196.
- [101] Taylor, J. A., Yeung, E. S., *Anal. Chem.* 1992, **64**, 1741-1744.
- [102] Nguyen, D. C., Keller, R. A., Jett, J. H., Martin, J. C., *Anal. Chem.* 1987, **59**, 2158-2161.
- [103] Wu, S. L., Dovichi, N. J., *J. Chromatogr.* 1989, **480**, 141-155.
- [104] Johnson, M. E., Landers, J. P., *Electrophoresis* 2004, **25**, 3513-3527.
- [105] Okerberg, E., Shear, J. B., *Anal. Chem.* 2001, **73**, 1610-1613.

- [106] Dada, O. O., Ramsay, L. M., Dickerson, J. A., Cermak, N., Jiang, R., Zhu, C. R., Dovichi, N. J., *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, **397**, 3305-3310.
- [107] Lacroix, M., Poinso, V., Fournier, C., Couderc, F., *Electrophoresis* 2005, **26**, 2608-2621.
- [108] Swaile, D. F., Sepaniak, M. J., *J. Liq. Chromatogr.* 1991, **14**, 869-893.
- [109] Tong, W., Yeung, E. S., *J. Chromatogr. B* 1996, **685**, 35-40.
- [110] Chan, K. C., Muschik, G. M., Issaq, H. J., *Electrophoresis* 2000, **21**, 2062-2066.
- [111] Sluszný, C., He, Y., Yeung, E. S., *Electrophoresis* 2005, **26**, 4197-4203.
- [112] Swart, R., Elgersma, J. W., Kraak, J. C., Poppe, H., *J. Microcol. Sep.* 1997, **9**, 591-600.
- [113] Veleo, M. T., Lara-Quintanar, P., de Frutos, M., Díez-Masa, J. C., en: Marina, M. L., Ríos, A., Valcárcel, M. (Ed.), *Analysis and Detection by Capillary Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam 2005, pp. 305-374.
- [114] Kuhr, W. G., Yeung, E. S., *Anal. Chem.* 1988, **60**, 2642-2646.
- [115] Kuhr, W. G., Yeung, E. S., *Anal. Chem.* 1988, **60**, 1832-1834.
- [116] Underberg, W. J. M., Waterval, J. C. M., *Electrophoresis* 2002, **23**, 3922-3933.
- [117] Zhao, J. Y., Waldron, K. C., Miller, J., Zhang, J. Z., Harke, H., Dovichi, N. J., *J. Chromatogr.* 1992, **608**, 239-242.
- [118] Pinto, D., Arriaga, E. A., Schoenherr, R. M., Chou, S. S. H., Dovichi, N. J., *J. Chromatogr. B* 2003, **793**, 107-114.
- [119] Harmon, B. J., Patterson, D. H., Regnier, F. E., *Anal. Chem.* 1993, **65**, 2655-2662.
- [120] Feng, H. T., Li, S. F. Y., Chia, P. S., Loke, W. K., *J. Liq. Chromatogr.* 2006, **29**, 1447-1455.
- [121] Zhao, J.-Y., Labbe, J., Dovichi, N. J., *J. Microcol. Sep.* 1993, **5**, 331-339.
- [122] Oldenburg, K. E., Sweedler, J. V., *Analyst* 1997, **122**, 1581-1585.
- [123] Nirode, W. F., Staller, T. D., Cole, R. O., Sepaniak, M. J., *Anal. Chem.* 1998, **70**, 182-186.

- [124] Riechel, P., Weiss, T., Weiss, M., Ulber, R., Buchholz, H., Scheper, T., *J. Chromatogr. A* 1998, **817**, 187-193.
- [125] Lalljie, S. P. D., Sandra, P., *Chromatographia* 1995, **40**, 519-526.
- [126] Kaneta, T., Ogura, T., Imasaka, T., *Electrophoresis* 2011, **32**, 1061-1067.
- [127] Coble, P. G., Timperman, A. T., *J. Chromatogr. A* 1998, **829**, 309-315.
- [128] Ye, M. L., Hu, S., Quigley, W. W. C., Dovichi, N. J., *J. Chromatogr. A* 2004, **1022**, 201-206.
- [129] Le Potier, I., Franck, G., Smadja, C., Varlet, S., Taverna, M., *J. Chromatogr. A* 2004, **1046**, 271-276.
- [130] Wojcik, R., Swearingen, K. E., Dickerson, J. A., Turner, E. H., Ramsay, L. M., Dovichi, N. J., *J. Chromatogr. A* 2008, **1194**, 243-248.
- [131] Beale, S. C., Savage, J. C., Wiesler, D., Wietstock, S. M., Novotny, M., *Anal. Chem.* 1988, **60**, 1765-1769.
- [132] Pinto, D. M., Arriaga, E. A., Craig, D., Angelova, J., Sharma, N., Ahmadzadeh, H., Dovichi, N. J., Boulet, C. A., *Anal. Chem.* 1997, **69**, 3015-3021.
- [133] Lee, I. H., Pinto, D., Arriaga, E. A., Zhang, Z. R., Dovichi, N. J., *Anal. Chem.* 1998, **70**, 4546-4548.
- [134] Hu, S., Zhang, L., Cook, L. M., Dovichi, N. J., *Electrophoresis* 2001, **22**, 3677-3682.
- [135] Craig, D. B., Wetzl, B. K., Duerkop, A., Wolfbeis, O. S., *Electrophoresis* 2005, **26**, 2208-2213.
- [136] Meier, R. J., Steiner, M. S., Duerkop, A., Wolfbeis, O. S., *Anal. Chem.* 2008, **80**, 6274-6279.
- [137] Ramsay, L. M., Dickerson, J. A., Dovichi, N. J., *Electrophoresis* 2009, **30**, 297-302.
- [138] Yu, M., Wang, H. Y., Woolley, A. T., *Electrophoresis* 2009, **30**, 4230-4236.
- [139] Bock, P. E., *Biochemistry* 1988, **27**, 6633-6639.

- [140] Bayle, C., Issac, C., Salvayre, R., Couderc, F., Causse, E., *J. Chromatogr. A* 2002, **979**, 255-260.
- [141] Carru, C., Deiana, L., Sotgia, S., Pes, G. M., Zinellu, A., *Electrophoresis* 2004, **25**, 882-889.
- [142] Chumsae, C., Gaza-Bulseco, G., Liu, H. C., *Anal. Chem.* 2009, **81**, 6449-6457.
- [143] Colyer, C., *Cell Biochem. Biophys.* 2000, **33**, 323-337.
- [144] Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I., Davison, M., *Proteomics* 2001, **1**, 377-396.
- [145] Moody, E. D., Viskari, P. J., Colyer, C. L., *J. Chromatogr. B* 1999, **729**, 55-64.
- [146] McCorquodale, E. M., Colyer, C. L., *Electrophoresis* 2001, **22**, 2403-2408.
- [147] Yan, W. Y., Sloat, A. L., Yagi, S., Nakazumi, H., Colyer, C. L., *Electrophoresis* 2006, **27**, 1347-1354.
- [148] Chiu, T. C., Lin, Y. W., Huang, C. C., Chrambach, A., Chang, H. T., *Electrophoresis* 2003, **24**, 1730-1736.
- [149] Benito, I., Marina, M. L., Saz, J. M., Diez-Masa, J. C., *J. Chromatogr. A* 1999, **841**, 105-114.
- [150] Harvey, M. D., Bablekis, V., Banks, P. R., Skinner, C. D., *J. Chromatogr. B* 2001, **754**, 345-356.
- [151] Sze, N. S. K., Huang, T. M., Pawliszyn, J., *J. Sep. Sci.* 2002, **25**, 1119-1122.
- [152] Hernandez-Borges, J., Borges-Miquel, T. M., Rodriguez-Delgado, M. A., Cifuentes, A., *J. Chromatogr. A* 2007, **1153**, 214-226.
- [153] Visser, N., Lingeman, H., Irth, H., *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, **382**, 535-558.
- [154] Guzman, N. A., Blanc, T., Phillips, T. M., *Electrophoresis* 2008, **29**, 3259-3278.
- [155] Chen, H. X., Busnel, J. M., Gassner, A. L., Peltre, G., Zhang, X. X., Girault, H. H., *Electrophoresis* 2008, **29**, 3414-3421.
- [156] Kalish, H., Phillips, T. M., *J. Chromatogr. B* 2010, **878**, 194-200.
- [157] Morales-Cid, G., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., *Anal. Chim. Acta* 2013, **773**, 89-96.

- [158] Georgiou, H. M., Rice, G. E., Baker, M. S., *Proteomics* 2001, *1*, 1503-1506.
- [159] Moreno, F. J., Jenkins, J. A., Mellon, F. A., Rigby, N. M., Robertson, J. A., Wellner, N., Mills, E. N. C., *Biochim. Biophys. Acta* 2004, *1698*, 175-186.
- [160] Jin, Y., Manabe, T., *Electrophoresis* 2005, *26*, 1019-1028.
- [161] Ros, A., Faupel, M., Mees, H., Van Oostrum, J., Ferrigno, R., Reymond, F., Michel, P., Rossier, J. S., Girault, H. H., *Proteomics* 2002, *2*, 151-156.
- [162] Righetti, P., Castagna, A., Herbert, B., Candiano, G., *Biosci. Rep.* 2005, *25*, 3-17.
- [163] Michel, P. E., Crettaz, D., Morier, P., Heller, M., Gallot, D., Tissot, J.-D., Reymond, F., Rossier, J. S., *Electrophoresis* 2006, *27*, 1169-1181.
- [164] Surowiec, I., Koistinen, K. M., Fraser, P. D., Bramley, P. M., *Meat Sci.* 2011, *89*, 233-237.
- [165] Yang, Y., Qiang, X., Owsiany, K., Zhang, S., Thannhauser, T. W., Li, L., *J. Proteome Res.* 2011, *10*, 4647-4660.
- [166] Ang, C.-S., Binos, S., Knight, M. I., Moate, P. J., Cocks, B. G., McDonagh, M. B., *J. Proteome Res.* 2011, *10*, 5059-5069.
- [167] Busnel, J.-M., Lion, N., Girault, H. H., *Anal. Chem.* 2007, *79*, 5949-5955.
- [168] Pourhaghighi, M. R., Karzand, M., Girault, H. H., *Anal. Chem.* 2011, *83*, 7676-7681.
- [169] Darby, S. M., Miller, M. L., Allen, R. O., LeBeau, M., *J. Anal. Toxicol.* 2001, *25*, 8-14.
- [170] Visser, N. F., van Harmelen, M., Lingeman, H., Irth, H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, *33*, 451-462.
- [171] Tomlinson, A. J., Benson, L. M., Jameson, S. C., Johnson, D. H., Naylor, S., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1997, *8*, 15-24.
- [172] Schmerr, M. J., Cutlip, R. C., Jenny, A., *J. Chromatogr. A* 1998, *802*, 135-141.
- [173] Li, W., Zhang, D., Lin, B., Su, Z., *Chromatographia* 2000, *52*, 451-454.

- [174] Westerlund, B., en: Simpson, R. J. (Ed.), *Purifying Proteins for Proteomics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2004, pp. 121-146.
- [175] Hedlung, H., en: Simpson, R. J. (Ed.), *Purifying Proteins for Proteomics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 2004, pp. 431-442.
- [176] McCue, J. T., *Methods Enzymol.* 2009, **463**, 405-414.
- [177] White, K. Y., Rodemich, L., Nyalwidhe, J. O., Comunale, M. A., Clements, M. A., Lance, R. S., Schellhammer, P. F., Mehta, A. S., Semmes, J., Drake, R. R., *J. Proteome Res.* 2009, **8** 620-630.
- [178] Boschetti, E., *J. Biochem. Biophys. Meth.* 2001, **49**, 361-389.
- [179] Linden, J. C., Lawhead, C. L., *J. Chromatogr. A* 1975, **105**, 125-133.
- [180] Xu, R. N., Fan, L., Rieser, M. J., El-Shourbagy, T. A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007, **44**, 342-355.
- [181] Guo, Y., Gaiki, S., *J. Chromatogr. A* 2011, **1218**, 5920-5938.
- [182] Lindner, H., Sarg, B., Helliger, W., *J. Chromatogr. A* 1997, **782**, 55-62.
- [183] Liu, Y., Dong, X. Y., Sun, Y., *Separ. Purif. Tech.* 2007, **53**, 289-295.
- [184] Loo, D., Jones, A., Hill, M. M., *J. Proteome Res.* 2010, **9**, 5496-5500.
- [185] Ueda, E. K. M., Gout, P. W., Morganti, L., *J. Chromatogr. A* 2003, **988**, 1-23.
- [186] Monzo, A., Bonn, G. K., Guttman, A., *Trends Anal. Chem.* 2007, **26**, 423-432.
- [187] Hage, D. S., Phillips, T. M., en: Hage, D. S. (Ed.), *Handbook of Affinity Chromatography*, Taylor & Francis, New York 2006, pp. 127-172.
- [188] Moser, A. C., Hage, D. S., en: Hage, D. S. (Ed.), *Handbook of Affinity Chromatography*, Taylor & Francis, New York 2006, pp. 789-836.
- [189] Ongay, S., Lacunza, I., Diez-Masa, J. C., Sanz, J., de Frutos, M., *Anal. Chim. Acta* 2010, **663**, 206-212.
- [190] Mallorquí, J., Llop, E., de Bolòs, C., Gutiérrez-Gallego, R., Segura, J., Pascual, J. A., *J. Chromatogr. B* 2010, **878**, 2117-2122.

- [191] de Frutos, M., Molina, E., Puerta, A., en: Gooding, K. M., Regnier, F. E. (Eds.), *HPLC of Biological Macromolecules*, Marcel Dekker Inc., New York 2002, pp. 653-688.
- [192] Moser, A. C., Hage, D. S., *Bioanalysis* 2010, 2, 769-790.
- [193] Campbell, D. H., Luescher, E., Lerman, L. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1951, 37, 575-578.
- [194] Clarke, W., Beckwith, J. D., Jackson, A., Reynolds, B., Karle, E. M., Hage, D. S., *J. Chromatogr. A* 2000, 888, 13-22.
- [195] Schiel, J. E., Mallik, R., Soman, S., Joseph, K. S., Hage, D. S., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 719-737.
- [196] Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Smith, P. K., *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, San Diego (California) 1992, pp. 64-69.
- [197] Hage, D. S., en: Corradini, D. (Ed.), *Handbook of HPLC*, Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton (Florida) 2010, pp. 361-384.
- [198] Larsson, P.-O., *Meth. Enzymol.* 1984, 104, 212-223.
- [199] Ruhn, P. F., Garver, S., Hage, D. S., *J. Chromatogr. A* 1994, 669, 9-19.
- [200] Acevedo, B., Perera, Y., Torres, E., Penton, D., Ayala, M., Gavilondo, J., *Prostate* 2006, 66, 1029-1036.
- [201] Puerta, A., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., *J. Immunol. Meth.* 2004, 289, 225-237.
- [202] Hage, D. S., *J. Chromatogr. B* 1998, 715, 3-28.
- [203] Delaunay, N., Pichon, V., Hennion, M. C., *J. Chromatogr. B* 2000, 745, 15-37.

Objetivos y Plan de Trabajo

OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS DOCTORAL

El objetivo general de esta Tesis es el desarrollo de métodos de análisis de PSA, que abarquen las etapas de preparación de muestra, separación por electroforesis capilar y detección, para el estudio de isoformas de esta glicoproteína en muestras de origen biológico, y que sean aplicables en el futuro para el estudio de dichas isoformas como potencial biomarcador de cáncer de próstata.

OBJETIVOS PARTICULARES

Teniendo en cuenta el objetivo general de la Tesis, el trabajo ha abordado tres objetivos particulares:

- 1. Desarrollo de métodos de electroforesis capilar para el análisis de isoformas del antígeno específico de próstata.*
- 2. Puesta a punto de métodos de cromatografía de inmunoafinidad para la purificación de PSA de muestras biológicas que permitan el análisis de sus isoformas por electroforesis capilar.*
- 3. Desarrollo de métodos de derivatización fluorescente de glicoproteínas para el análisis de sus isoformas por electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser.*

Estos objetivos se corresponden con los tres capítulos que se recogen en esta Memoria.

PLAN DE TRABAJO

Los objetivos particulares se abordaron mediante el siguiente plan de trabajo:

1. Desarrollo de métodos individuales de electroforesis en capilares con detección ultravioleta para la separación de isoformas de PSA, en condiciones compatibles con la derivatización fluorescente en-columna de la glicoproteína a través de sus grupos amino primarios.
 - 1.1. Empleo de recubrimientos del capilar que reducen la magnitud del flujo electroosmótico.
 - 1.2. Empleo de recubrimientos del capilar que suprimen el flujo electroosmótico.
2. Puesta a punto de un método de cromatografía de inmunoafinidad para la purificación de PSA, que permita el análisis de sus isoformas por los métodos de electroforesis capilar previamente obtenidos.
 - 2.1. Fabricación de las columnas de inmunoafinidad.
 - 2.2. Optimización del método inmunocromatográfico, para la captura y elución de la glicoproteína compatibles con el análisis de sus isoformas por electroforesis capilar.
 - 2.3. Aplicación de los métodos de purificación y análisis por electroforesis capilar desarrollados para el estudio de isoformas de PSA de muestras de plasma seminal de donantes.
3. Desarrollo de métodos para el marcado fluorescente de PSA que permitan el análisis de sus isoformas por electroforesis capilar con detección por

fluorescencia inducida por láser. Optimización de los métodos de derivatización con PSA patrón y comparación con otras proteínas modelo.

3.1. Derivatización fluorescente mediante marcado no-covalente con NanoOrange®.

3.2. Derivatización fluorescente mediante unión covalente.

3.2.1. Unión a través de grupos tiol.

3.2.2. Unión a través de grupos amino primarios.

Capítulo 1

*Métodos de electroforesis capilar para el análisis de
isoformas del antígeno específico de próstata*

ÍNDICE

1.1. INTRODUCCIÓN	105
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS	113
1.2.1. Muestra y reactivos	113
1.2.2. Instrumentación	113
1.2.3. Métodos de separación por CE	114
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	116
1.3.1. Empleo de morfolina como recubrimiento dinámico del capilar	116
1.3.1.1. Optimización del método de CZE	117
1.3.1.2. Repetibilidad y resolución del método de CZE para la separación de isoformas de PSA	124
1.3.1.3. Efecto de la desglicosilación de PSA sobre el perfil de isoformas obtenido por CZE	126
1.3.2. Empleo de polímeros hidrófilos como recubrimientos del capilar	130
1.3.3. Empleo de bromuro de decametONIO como recubrimiento dinámico del capilar	133
1.3.3.1. Efecto de la concentración del aditivo en el BGE sobre la separación de isoformas de PSA por CZE	133
1.3.3.2. Repetibilidad del método	137
1.3.3.3. Efecto del SDS sobre la separación de isoformas de PSA por CZE	139
1.3.4. Empleo de recubrimientos que suprimen el EOF	141
1.3.4.1. Empleo de UltraTrol LN en la separación de isoformas de PSA	142
1.3.4.2. Empleo de EOTrol LN en el BGE como recubrimiento dinámico del capilar	147
1.3.4.3. Estudio de repetibilidad con el empleo de UltraTrol LN	148
1.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	150
1.5. REFERENCIAS	153

1.1. INTRODUCCIÓN

Ante la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores de cáncer de próstata con mayor especificidad que los actuales, y teniendo en cuenta los antecedentes que indican las diferencias en formas moleculares de PSA entre muestras de sanos y enfermos con cáncer de próstata, la CE parece una herramienta útil y prometedora para la obtención de perfiles de las diferentes formas de PSA.

Antes de continuar, es necesario aclarar los conceptos de formas, glicoformas, subformas e isoformas que se emplean en esta Memoria relacionados con las separaciones electroforéticas de glicoproteínas, como es el caso de PSA. Las diferentes especies moleculares de la glicoproteína, debidas a las heterogeneidades en su cadena peptídica, en la glicosilación, o a otras modificaciones post-traducción (PTMs) se denominan formas o formas moleculares. Las formas en que las diferencias estriban en la cadena glicosídica se mencionan como glicoformas. Los términos subformas e isoformas se emplean, tanto en separaciones en geles como en capilares, para hacer referencia a los diferentes spots o picos electroforéticos observados para una misma glicoproteína [1, 2]. En la bibliografía, en algunas ocasiones, se denominan glicoformas a los picos de glicoproteínas obtenidos por CE. Sin embargo, en las separaciones por CZE, que es el modo más empleado en separaciones de isoformas de glicoproteínas intactas, y en el caso concreto de PSA, en que las diferencias en tiempo de migración de los picos pueden ser debidas a la carga o al tamaño molecular (formas inactivas del PSA), diferentes formas moleculares podrían migrar debajo de cada pico. Por tanto, en principio, no se puede elucidar la naturaleza de cada pico electroforético, por lo que no se considera apropiado el término glicoforma para designarlo. Por ello, en adelante, el término isoforma se empleará para denominar a cada pico electroforético independientemente de las formas moleculares de la glicoproteína que migran juntas bajo ese pico.

A pesar del elevado poder de resolución que posee la 2D-GE como técnica de separación, la CE presenta algunas ventajas frente a las separaciones en geles. Por un

lado, la posibilidad de automatización en los equipos comerciales reduce drásticamente los tiempos de análisis y la manipulación por parte del operario. Por otro lado, la posibilidad de cuantificación directa en CE facilita el análisis de perfiles de isoformas de glicoproteínas a la hora de comparar entre muestras diferentes. Además, la CE proporciona la eficacia suficiente para separar con buena resolución las isoformas de glicoproteínas, que en la mayoría de casos poseen características estructurales muy similares, como ya se ha demostrado en muchas ocasiones [3].

Las separaciones por CE se han empleado para el análisis de isoformas de glicoproteínas intactas en algunos casos de interés clínico, como son la ribonucleasa B (RibB), la transferrina (Tf), la eritropoyetina (EPO), la α 1-glicoproteína ácida (AGP) o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Los modos de separación empleados, que como ocurre para proteínas en general son los más comunes, han sido el CIEF [4-6] y la CZE [7-11].

El problema que plantea el análisis de glicoproteínas por CE es que pueden sufrir fenómenos de adsorción a la pared del capilar, en especial las que poseen un pI elevado, fundamentalmente debidos a interacciones electrostáticas con los grupos silanol [12]. Towns y Regnier diseñaron un sistema de CE que permitía calcular la proporción de proteína que se adsorbía al capilar de sílice sin recubrir en separaciones a pH 7. Estudiando algunos casos concluyeron que aquellas proteínas con un pI mayor de 9,0 tenían una recuperación del 0%, proteínas tales como quimotripsinógeno, ribonucleasa A, citocromo C y lisozima, las cuales quedaban totalmente adsorbidas a la pared del capilar [13]. Los fenómenos de adsorción parcial de proteínas, además de dificultar la cuantificación, producen ensanchamiento de picos, con la consecuente pérdida de resolución, hacen los análisis menos repetitivos y en muchas ocasiones hacen imposible la regeneración del capilar. Como se ha apuntado brevemente en la Introducción General, entre las diferentes formas de solucionar este problema se encuentra el empleo de capilares recubiertos, bien mediante un recubrimiento permanente de la pared interna del capilar o mediante

un recubrimiento dinámico de ésta. En el primero, se utiliza una sustancia que se une covalentemente a la superficie de sílice, formando un recubrimiento químicamente estable. En el segundo, el aditivo se añade al BGE. Existen además aditivos que podrían considerarse como intermedios, ya que su unión a la pared no es covalente, pero no se añaden al BGE sino que el capilar se recubre con ellos por adsorción previamente al análisis.

El recubrimiento permanente del capilar se suele realizar con polímeros de diferente naturaleza. Los polímeros unidos covalentemente que se emplean habitualmente son derivados de poliacrilamida, de polietilenglicol y derivados de celulosa o dextranos [14]. La unión covalente implica un proceso que en ocasiones puede resultar largo y tedioso, y además estos capilares suelen tener una duración corta, ya que el recubrimiento no se puede regenerar.

En el recubrimiento dinámico se realiza la adición al BGE de compuestos químicos que presenten una elevada afinidad por los grupos silanol de la superficie interna del capilar, de forma que su energía de adsorción a ellos sea superior a la de las proteínas. Los recubrimientos de este tipo se eliminan y regeneran posteriormente a cada separación electroforética, para garantizar la repetibilidad de la separación. Dada la comodidad de este modo de recubrimiento y su utilidad en separaciones por CE de proteínas, el número de sustancias empleadas para el recubrimiento dinámico del capilar es bastante elevado. Fundamentalmente, podrían clasificarse en tres tipos: compuestos poliméricos, tensioactivos y compuestos de bajo peso molecular con grupos amino, que se pueden ver representados en la Figura 1.1. Los polímeros que se utilizan como recubrimientos dinámicos son polímeros hidrófilos solubles en tampones acuosos, como son el polivinil alcohol o los derivados de celulosa [15], aunque en este modo de recubrimiento son menos eficaces que cuando se emplean como recubrimientos permanentes [12]. Los tensioactivos empleados como recubrimientos dinámicos del capilar son de dos tipos:

no iónicos, como el Brij® 35 o el Triton X-100, e iónicos, como el CHAPS o la caprilil sulfobetaina SB-10.

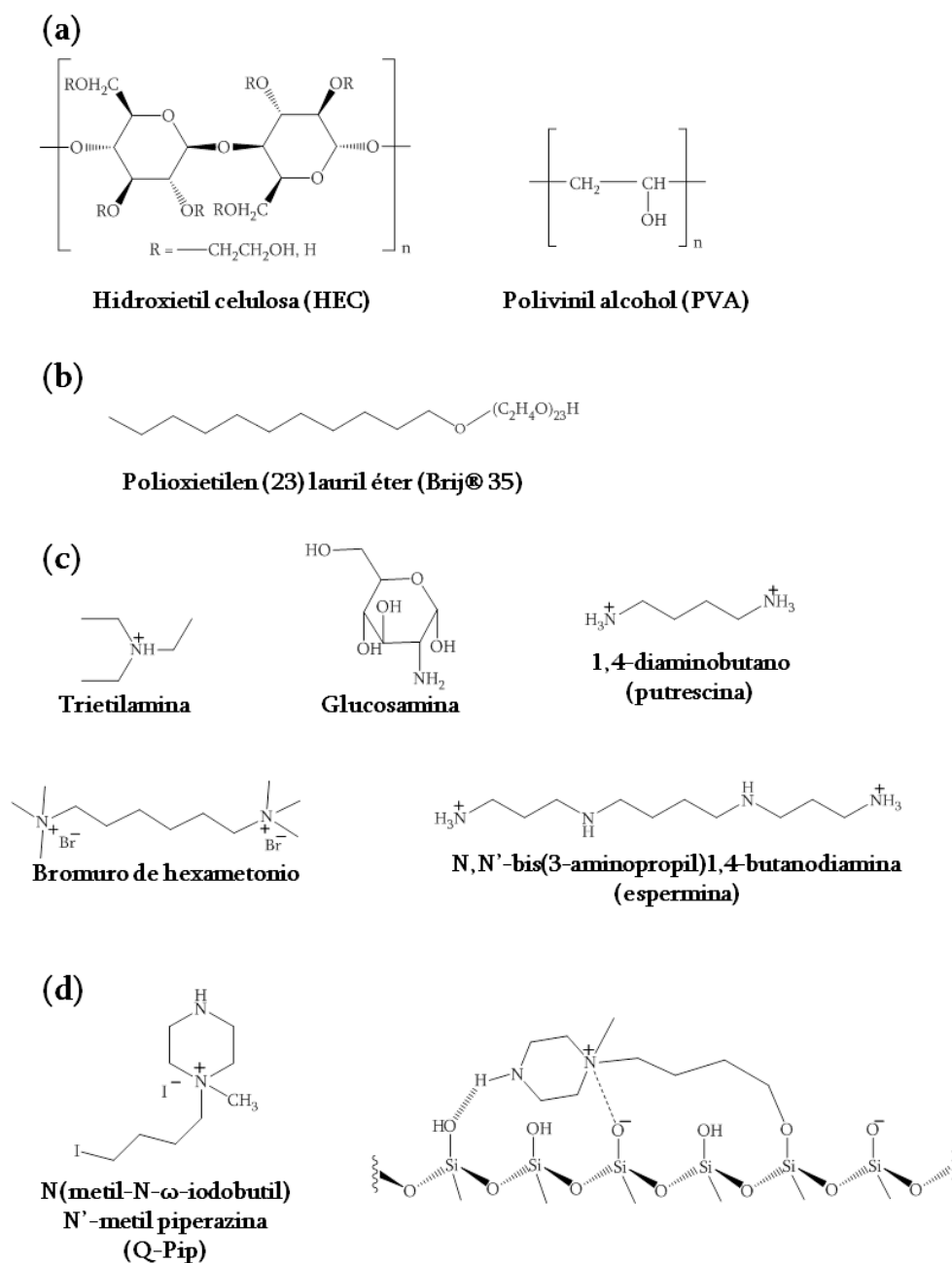


Figura 1.1. Algunos compuestos empleados como recubrimientos dinámicos del capilar, añadidos al BGE. (a) aditivos poliméricos, (b) aditivo tensioactivo, (c) aditivos de bajo peso molecular con grupos amino y (d) aditivo Q-Pip, del denominado tipo *Skorpio* y su mecanismo de adsorción sobre la sílice del capilar [15].

Las sustancias más empleadas como recubrimientos dinámicos del capilar corresponden a los compuestos de bajo peso molecular con grupos amino en su estructura, de los que existen una gran variedad. Como se puede ver en la Figura 1.1, se han empleado desde monoaminas, como trietilamina, propilamina, morfolina, glucosamina, etanolamina o cloruro de tetrametilamonio, pasando por diaminas, como putrescina, cadaverina o etilendiamina y oligoaminas como la espermina, trietilentetraamina o el ciclen, hasta llegar finalmente a las poliaminas, como son el quitosano o la polietilenimina [15]. Aunque también son compuestos diaminados, los alcanos de bis-amonio cuaternario, como el bromuro de hexametonio, han demostrado ser más eficaces como recubrimientos dinámicos que las diaminas [16]. Otros compuestos que han demostrado una enorme eficacia son algunos derivados de piperazina, con un nitrógeno cuaternizado, denominados *Skorpio*, debido a su peculiar comportamiento [17]. La molécula de estos compuestos se une inicialmente a la sílice del capilar mediante un puente de hidrógeno a través de un grupo amino secundario y una unión electrostática por el nitrógeno cuaternario, para posteriormente unirse covalentemente a través de un grupo metileno unido a un átomo de yodo (Figura 1.1 (d)).

Además de disminuir la interacción de las proteínas con la pared del capilar, los recubrimientos modifican el potencial zeta, ζ , de la doble capa generada en la superficie de sílice modificando la μ_{EOF} , como se puede deducir de la ecuación I.3. Bajo la acción de los recubrimientos del capilar, la μ_{EOF} disminuye, en ocasiones hasta suprimirse e incluso revertir el EOF si cambia la carga en la superficie del capilar [18]. Como ya se comentó en la sección I.2.1.3, la magnitud del EOF puede afectar a la resolución entre picos electroforéticos, con lo cual este parámetro es de gran importancia a la hora de separar las diferentes isoformas de glicoproteínas; esta separación requiere elevada eficacia y, además, elevada selectividad, parámetro controlado también por la magnitud del EOF. En la ecuación 1.1 se puede ver la

influencia de la eficacia, N , y de la selectividad, $\Delta\mu/\bar{\mu}$, sobre la resolución en la separación.

$$R_s = \left(\frac{1}{4}\right) N^{1/2} \left(\frac{\Delta\mu}{\bar{\mu}}\right) \quad (\text{Ec. 1.1})$$

donde $\Delta\mu$ y $\bar{\mu}$ son, respectivamente, la diferencia y el valor medio de las movilidades electroforéticas aparentes (μ_{ap}) de ambos picos y N es la eficacia expresada en número de platos teóricos. Por otro lado, si el único fenómeno que contribuye al ensanchamiento de la banda electroforética es la difusión molecular, el valor de N viene dado por:

$$N = \left(\frac{\mu_{ap}El}{2D}\right) \quad (\text{Ec. 1.2})$$

siendo E la intensidad del campo eléctrico aplicado, l la longitud efectiva de separación y D el coeficiente de difusión. Substituyendo N en la ecuación 1.1 obtenemos una nueva expresión para la resolución:

$$R_s = \left(\frac{1}{4\sqrt{2}}\right) (\Delta\mu) \left(\frac{V}{D(\bar{\mu} + \mu_{EOF})}\right)^{1/2} \quad (\text{Ec. 1.3})$$

donde V corresponde a la diferencia de potencial eléctrico aplicado. En la ecuación 1.3, se puede observar la clara influencia de la magnitud de la μ_{EOF} sobre la resolución y pone de manifiesto que la resolución es menor cuando tenemos una movilidad del EOF elevada. El empleo de recubrimientos dinámicos añadidos al BGE, puede ser entonces de gran utilidad para la separación de isoformas de PSA, ya que reducen el EOF y además su empleo es relativamente sencillo. Por otra parte, el empleo de

recubrimientos de tipo diamina, parece influir también en la resolución de isoformas de glicoproteínas, probablemente por interacción con éstas formando pares iónicos [11].

Otros factores que pueden afectar a la resolución de isoformas de glicoproteínas en el modo de CZE son el pH y la composición iónica del BGE. El pH óptimo para la resolución de las isoformas suele estar en un intervalo próximo al valor del pI de la glicoproteína, debido a que es en ese intervalo de pI donde las diferencias de carga entre isoformas es mayor [3]. En cuanto a la composición del BGE, los tampones de borato son muy empleados en la separación de isoformas de glicoproteínas por CZE, ya que estos aniones pueden interaccionar con los grupos 1,2-diol, principalmente en configuración *cis*, de los carbohidratos presentes en la glicoproteína, favoreciendo la separación de sus isoformas [19, 20].

Donohue y col. mostraron en 2005 la separación de isoformas de PSA por CZE para varios patrones comerciales de la proteína, obteniendo buena reproducibilidad entre análisis [21]. La separación mostraba la presencia de 4-6 isoformas, dependiendo del patrón analizado, en un BGE que contenía aniones borato y putrescina, que actuaba como recubrimiento dinámico del capilar. Aparentemente, algunos de los patrones empleados en esa publicación, presentaban inestabilidad con el tiempo de almacenamiento, lo que se manifestaba en cambios en el perfil electroforético del patrón con el tiempo, y que los autores atribuyeron presumiblemente a la actividad enzimática del PSA. Los autores también mostraron la influencia de la putrescina sobre la separación de las isoformas, comprobando que en ausencia del recubrimiento no se conseguía resolución.

Por otro lado, dada la baja concentración de PSA presente en fluidos biológicos como el suero o la orina, en la que se encuentra del orden de ng/ml [22], es inviable su monitorización con el detector más común en análisis de proteínas por CE, la detección UV, aunque sí sería posible en plasma seminal, donde su concentración es relativamente elevada, del orden de mg/ml. Debido a la facilidad de

extracción de muestras como sangre u orina, su empleo es preferible en análisis clínico. Por esta razón, es necesario disponer de métodos de detección más sensibles para poder analizar las isoformas de PSA a tan baja concentración. Una interesante alternativa a la detección UV en CE es la detección LIF aunque, como ya se comentó en la Introducción General, en la mayoría de los casos es necesaria la derivatización fluorescente de las proteínas para su detección por fluorescencia. En este sentido, la derivatización a través de los grupos amino y en el modo “en-capilar” ha demostrado ser una estrategia muy adecuada para la detección por LIF de proteínas, en términos de sensibilidad, rapidez y automatización del proceso [23]. La derivatización fluorescente en-capilar se realiza en los primeros centímetros del capilar mediante la inyección consecutiva de un *plug* de muestra y otro de reactivo fluorogénico, tras lo cual se aplica un voltaje para permitir la reacción entre ambos. Por otro lado, los recubrimientos dinámicos del capilar más empleados para la separación de isoformas de glicoproteínas corresponden a los compuestos de diaminas, como la putrescina, que se empleó para la separación por CE de isoformas de PSA mencionada anteriormente. Los compuestos como la putrescina que poseen grupos amino primarios, pueden reaccionar también con el reactivo fluorogénico si la derivatización tiene lugar a través de grupos amino y generar un elevado ruido de fondo, por tanto, son incompatibles con la derivatización en-capilar de la proteína a través de estos grupos.

Teniendo en cuenta todos estos aspectos, el objetivo del trabajo experimental recogido en este capítulo consistió en el desarrollo, optimización y obtención de métodos de CE para la separación de isoformas de PSA. Para el desarrollo de los métodos se planteó el empleo de diferentes recubrimientos dinámicos añadidos o no en el BGE y que fueran compatibles con la derivatización fluorescente del PSA a través de los grupos amino. De los métodos de derivatización del PSA para su análisis por CE-LIF se hablará más adelante, en el Capítulo 3.

1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Muestra y reactivos

La muestra utilizada para todo el desarrollo y optimización de los métodos fue el patrón europeo de PSA, purificado de plasma seminal humano y adquirido a *Resource Technology* (Salisbury, Reino Unido). El patrón de proteína se suministró como sólido liofilizado en atmósfera inerte de Ar, que se reconstituyó en agua para obtener una solución de concentración 1 mg/ml, se dividió en alícuotas y se conservó a -20°C hasta su análisis.

Los reactivos utilizados fueron ácido clorhídrico, dihidrógeno fosfato de sodio, SDS, hidróxido sódico y metanol suministrados por *Merck* (Darmstadt, Alemania), bromuro de decametONIO, morfolina, tetraborato sódico, óxido de polietileno (PEO, PM medio \approx 200.000) y metil-(hidroxietil) celulosa (MHEC, PM medio \approx 90.000) comprados a *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, Estados Unidos) y, por último, las disoluciones de polímeros comerciales llamadas EOTrol® LN y UltraTrol® LN suministradas por *Target Discovery* (Palo Alto, CA, Estados Unidos). Todas las disoluciones se prepararon con agua de calidad ultrapura, obtenida de un sistema de purificación Milli-Q® suministrado por *Millipore* (Bedford, MA, Estados Unidos).

Todas las disoluciones, a excepción de la disolución de muestra, fueron filtradas a través de filtros de jeringa con membrana de nylon y un tamaño de poro de 0,2 μ m, adquiridos a *Teknokroma* (Barcelona) antes de ser introducidas en el capilar para los análisis por CE.

1.2.2. Instrumentación

Todas las separaciones electroforéticas se realizaron en un instrumento de CE, modelo G1600AX, fabricado por *Agilent Technologies* (Waghäusel, Alemania) con un detector de tipo fila de diodos para la detección UV-Vis. El control del aparato y

la colección de datos se llevó a cabo mediante el programa *3D-CE ChemStation*, también de *Agilent Technologies*.

Los capilares empleados para las separaciones fueron suministrados por *Polymicro Technologies* (Phoenix, AZ, Estados Unidos) y consistieron en tubos de sílice fundida sin recubrimiento interior, de 50 μm de diámetro interno y 375 μm de diámetro externo.

1.2.3. Métodos de separación por CE

Los diferentes recubrimientos dinámicos empleados en la separación de isoformas de PSA, se pueden clasificar en dos grupos en función del efecto que producen sobre el EOF. En primer lugar, aquéllos que reducen la magnitud del EOF en función de la concentración en que se encuentran en el BGE, de los que se han empleado morfolina, PEO, MHEC y bromuro de decametonio. Adicionalmente, el PEO también se ha aplicado al capilar de forma previa a la separación, sin adicionarse al BGE. En segundo lugar, aquellos recubrimientos dinámicos que se emplean para suprimir el EOF. En este sentido, se han utilizado dos soluciones comerciales de polímeros, llamados UltraTrol LN y EOTrol LN, el primero de ellos aplicado al capilar de modo previo a la separación electroforética y el segundo disuelto en el BGE. Tanto para los recubrimientos que disminuyen el EOF como para los que lo eliminan, se estudiaron diferentes factores que afectan a la resolución de isoformas de PSA, tales como composición y pH del BGE, voltaje y longitud de separación o concentración del aditivo.

Para el primer tipo de recubrimientos, se emplearon capilares de longitud efectiva de 51 y 70 cm (59,5 y 78,5 cm de longitud total, respectivamente), las separaciones se llevaron a cabo a 35°C y a un potencial de 25 kV en polaridad positiva (se entiende polaridad positiva cuando el cátodo se sitúa en el extremo del capilar más próximo al detector) y la inyección de muestra fue en todos los casos en el extremo anódico. Usando este tipo de recubrimientos y antes de realizar ninguna

separación, los capilares nuevos se acondicionaron utilizando la secuencia de lavados siguiente, aplicada por duplicado: 30 min con NaOH 1 M, 5 min con agua y 15 min con NaOH 0,1 M. Entre inyecciones también se aplicó un protocolo de lavado para asegurar la regeneración del capilar, que constó de la secuencia siguiente: 3 min con agua, 10 min con NaOH 0,1 M, 3 min con agua y, por último, 5 min con BGE. Adicionalmente, para cada capilar nuevo y antes de realizar ninguna separación con PSA, se realizaron con el mismo método de CE varias inyecciones de agua, que actúa como marcador del EOF, hasta que se obtuvo una desviación estándar relativa (RSD) para el tiempo de migración del marcador de EOF inferior a 0,5%. En este punto, se considera que el capilar está estabilizado.

Cuando se usaron los recubrimientos UltraTrol LN y EOTrol LN, las longitudes de capilar efectivas fueron de 8,5 y 70 cm, para una longitud total de 78,5 cm, y de 25 cm cuando se utilizó una longitud total de 33,5 cm. Las longitudes de capilar vienen determinadas por la configuración del cartucho suministrado para el equipo empleado, siendo 8,5 cm la longitud desde la ventana de detección hasta el extremo de capilar más próximo y 33,5 cm la longitud total de capilar más corta que se puede emplear. Para este tipo de recubrimientos, la inyección de muestra se ensayó en ambos extremos, anódico y catódico, lo que también determinó en cada caso la longitud efectiva de separación. Las separaciones se llevaron a cabo a 20°C, según instrucciones del fabricante del recubrimiento, y a voltajes de separación variables. Los capilares nuevos fueron acondicionados siguiendo esta vez el protocolo establecido por el fabricante de estos recubrimientos. La secuencia de acondicionamiento fue la siguiente: 5 min con MeOH, 2 min con agua, 5 min con HCl 1 M, 2 min con agua, 10 min con NaOH 1 M, 2 min con agua y 2 min con BGE. Entre inyecciones, los protocolos de lavado variaron para cada una de las dos soluciones de polímero. Para UltraTrol LN, que se aplica previamente a la separación, se lavó el capilar primero durante 10 min con NaOH 1 M, seguido de 2 min con agua, para aplicar a continuación el recubrimiento durante 2 min y,

finalmente, se lavó 2 min con el BGE. En el caso de EOTrol LN, el capilar se lavó durante 10 min con NaOH 1 M y 2 min con agua después de cada separación, para aplicar finalmente durante 2 min el BGE en el que va disuelto el EOTrol.

Para todos los métodos empleados, los lavados del capilar se realizaron a 1 bar de presión y la inyección hidrodinámica de la muestra se realizó a 35 mbar de presión durante 30 segundos. En todos los casos, la detección UV se realizó a 214 nm.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el desarrollo de los métodos de CZE, se emplearon diferentes sustancias que interaccionan con la sílice sobre la pared interna del capilar por diferentes mecanismos y que no contienen grupos amino primario. La interacción de estas sustancias con la sílice, permite el bloqueo de las interacciones indeseadas de las proteínas con la pared del capilar durante la separación, así como la disminución de la magnitud del EOF, favoreciendo la resolución de los componentes de la muestra. Para cada uno de los recubrimientos empleados, se estudió el efecto de factores que afectan al tiempo de migración, resolución y número de picos de PSA observados, con el objetivo de obtener las mejores condiciones de separación en cada caso.

1.3.1. Empleo de morfolina como recubrimiento dinámico del capilar

La morfolina ya ha sido previamente utilizada, de forma satisfactoria, como recubrimiento del capilar en separaciones por CZE de proteínas básicas para evitar la adsorción de éstas sobre la sílice, incluso con la elevada tendencia que tienen estas especies por este tipo de interacción [24, 25] y también ha sido empleada en la separación de isoformas de EPO, que es una glicoproteína ácida [26]. La morfolina (Figura 1.2) es una amina cíclica que posee un pK_a de 8,33, presentando carga

positiva en un amplio intervalo de pH, lo que le permite interaccionar con los grupos silanol de la sílice en el capilar.

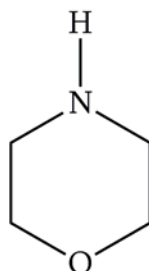


Figura 1.2. Estructura de la morfolina

1.3.1.1. Optimización del método de CZE

Los experimentos para el estudio de la morfolina como recubrimiento dinámico del capilar se llevaron a cabo en un capilar de 78,5 cm de longitud total y 70 cm de efectiva. La temperatura de separación fue 35°C, empleada satisfactoriamente con anterioridad para la separación de isoformas de EPO y AGP [2, 10, 26, 27]. El BGE empleado inicialmente consistió en una mezcla de fosfato y tetraborato, ya que según estudios previos, la mezcla de estos iones favorece la separación de isoformas por CZE de glicoproteínas frente al uso de cualquiera de ambos por separado [7, 11]. El efecto del tetraborato podría estar relacionado, como se ha comentado antes, con la formación de complejos con los grupos 1,2-diol en los azúcares de la glicoproteína, mientras que la acción de los iones fosfato podría asociarse a interacciones con la sílice del capilar [28]. El empleo de un BGE compuesto de tetraborato sódico 5 mM, dihidrógeno fosfato sódico 10 mM y morfolina 50 mM ajustado a pH 9,5, permitió la separación de 8 isoformas de PSA en aproximadamente 7 minutos (Figura 1.3c). A continuación se procedió a modificar las concentraciones de fosfato y borato en el BGE para comprobar el efecto en la resolución.

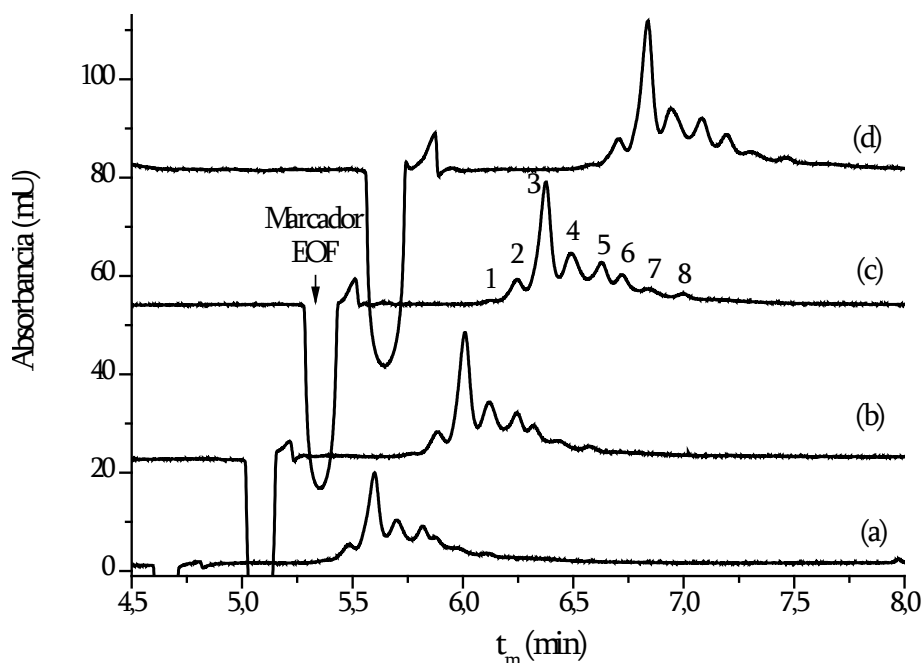


Figura 1.3. Efecto de la concentración de fosfato en el BGE sobre la separación por CZE de isoformas de PSA 1 mg/ml. BGE: tetraborato sódico 5 mM, morfolina 50 mM y dihidrógeno fosfato sódico (a) 0 mM, (b) 5 mM, (c) 10 mM y (d) 20 mM, pH 9,5. Condiciones de separación: $L = 78,5$ cm, $l = 70$ cm, 35°C y 25 kV. Inyección hidrodinámica a 35 mbar durante 30 s. Detección UV a 214 nm.

La concentración de fosfato se varió entre 0 y 20 mM. En la Figura 1.3 se puede observar el efecto de la concentración de este ion en la separación de isoformas de PSA, destacando dos efectos. En primer lugar, el EOF aumenta su t_m indicando que su magnitud se ve disminuida cuando aumenta la concentración del ión. En segundo lugar, la resolución entre isoformas aumenta a medida que aumenta también la concentración de fosfato. La disminución en la magnitud del EOF tiene su origen en el aumento de la fuerza iónica, ya que el aumento de la concentración de este tipo de electrolitos en el BGE producen la disminución del potencial zeta y en consecuencia la disminución de la μ_{EOF} [29]. La mejora en la resolución se produce en mayor medida en las isoformas con mayor t_m , que podrían corresponder con las isoformas más ácidas, es decir, aquellas con mayor carga negativa. En ausencia del ión fosfato (Figura 1.3a), la resolución entre isoformas disminuye y además el pico 1 no se detecta. A concentraciones mayores de 10 mM de fosfato, la resolución no

aumenta pero sí lo hace el t_m , incrementándose por tanto el tiempo de análisis, por lo cual, 10 mM de fosfato resultó la concentración más adecuada.

A continuación, se modificó la concentración de tetraborato en el BGE entre 1 y 15 mM, manteniendo constante la concentración de fosfato a 10 mM. Como se puede ver en la Figura 1.4, la resolución empeora cuando la concentración de tetraborato aumenta o disminuye de 5 mM, siendo más evidente a concentraciones superiores de tetraborato debido a un ensanchamiento de los picos (Figuras 1.4c y d). En cuanto al marcador de EOF, igual que ocurre para el fosfato, su tiempo de migración se incrementa al aumentar la concentración de tetraborato en el BGE, como es teóricamente previsible. El aumento de la concentración del ión tetraborato en el BGE puede producir dos efectos, por un lado, el aumento de la fuerza iónica y por consiguiente la disminución de la μ_{EOF} , y por otro lado, un aumento en la concentración de los complejos 1,2-diol/borato, que incrementaría la carga negativa del PSA. Ambos efectos disminuyen la μ_{ef} de las distintas isoformas del PSA y, por tanto, aumentan su t_m .

Del estudio de la concentración de ambos iones, fosfato y tetraborato, se pudo concluir que las concentraciones óptimas para cada uno correspondieron a 10 y 5 mM, respectivamente.

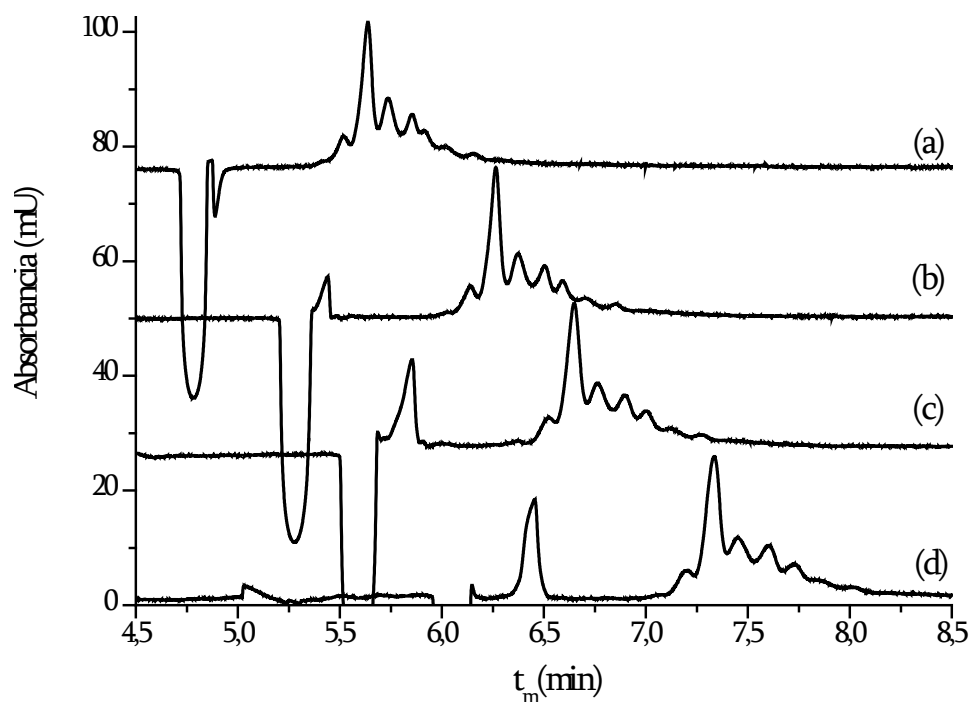


Figura 1.4. Efecto de la concentración de tetraborato en el BGE sobre la separación por CZE de isoformas de PSA 1 mg/ml. BGE: dihidrógeno fosfato sódico 10 mM, morfolina 50 mM y tetraborato sódico (a) 1 mM, (b) 5 mM, (c) 10 mM y (d) 15 mM, pH 9,5. Resto de condiciones como en Figura 1.3.

El siguiente paso fue modificar el pH del BGE. Como ya se ha comentado, la forma más habitual de trabajar en separación por CZE de isoformas de glicoproteínas corresponde a un pH próximo al pI. Cuanto más cercano es el pH al pI, mayores son las diferencias de carga entre las diferentes isoformas pero al mismo tiempo, menor es la carga global de las moléculas de glicoproteína. Si como en este caso a $\text{pH} > \text{pI}$, la μ_{ef} tiene signo contrario a la μ_{EOF} , las isoformas presentarán un t_m menor cuanto más semejantes sean pH y pI, lo que puede afectar también a la resolución.

El pH del BGE se modificó dentro de un intervalo entre 8,5 y 10, manteniendo constantes el resto de condiciones, y su efecto sobre la separación se resume en la Figura 1.5. Observando dicha Figura, el primer efecto que se puede apreciar es la disminución en el t_m del marcador del EOF a medida que el pH aumenta, debido probablemente a que a mayor pH, la ionización de los grupos silanol en la sílice se hace más importante, aumentando la magnitud del EOF y

disminuyendo su t_m . En este intervalo de pH, la ionización de los grupos silanol debería ser casi completa, por lo que, como se puede apreciar con más claridad entre pH 9,5 y 10,0, la diferencia entre los t_m del EOF no es muy marcada. Otra causa más importante del aumento en la magnitud del EOF, podría ser la ionización de la morfolina para la que, a medida que aumenta el pH y se aleja de su pK_a (8,33), la forma que predomina es la neutra con lo que se perdería efectividad en el recubrimiento del capilar, aumentando la magnitud del EOF y por tanto disminuyendo su t_m . De acuerdo con la variación en la ionización, el cambio en el EOF es más acusado para valores de $pH < pK_a + 1$.

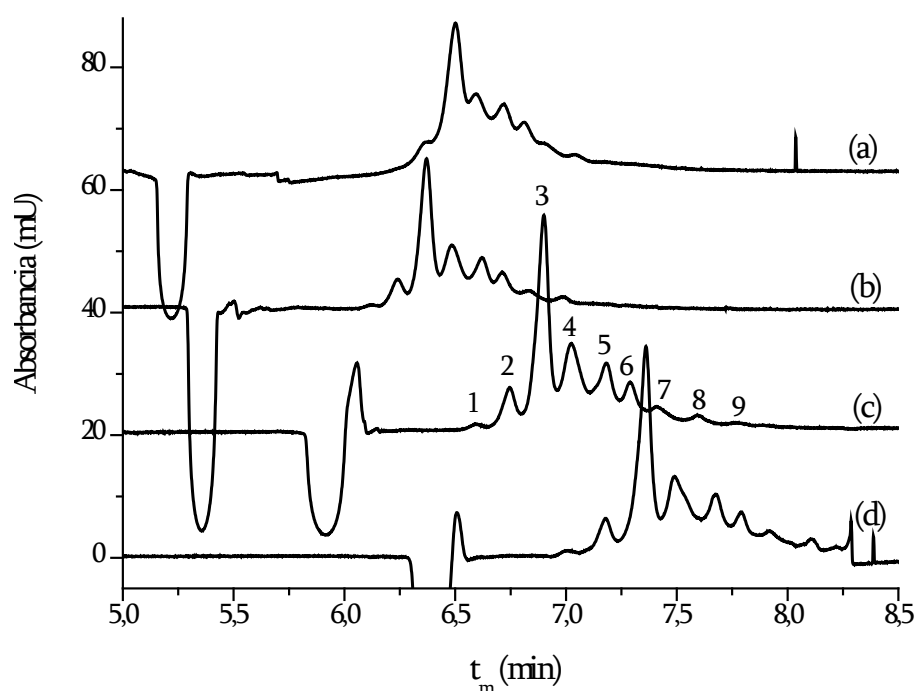


Figura 1.5. Efecto del pH del BGE sobre la separación por CZE de isoformas de PSA 1 mg/ml. BGE: dihidrógeno fosfato sódico 10 mM, tetraborato sódico 5 mM, morfolina 50 mM y pH ajustado a (a) 10,0, (b) 9,5, (c) 9,0 y (d) 8,5. Resto de condiciones como en Figura 1.3.

Otro efecto que se observa es que cuanto más básico es el pH, más alejados se encuentran los picos de PSA del EOF. Esto se debe a que a mayor pH, las isoformas presentan una carga global negativa mayor y por tanto una mayor μ_{ef} de signo

contrario a μ_{EOF} , con lo que su t_m debería ser también mayor; sin embargo, la mayor μ_{ef} de las isoformas de PSA se compensa con la mayor movilidad correspondiente al EOF, por lo que aumenta la diferencia entre los t_m de los picos de PSA y del marcador de EOF, aunque no siempre aumenta el t_m para las isoformas de PSA.

También se puede observar que a pH 8,5 o 9,0, la sensibilidad para los picos de PSA, con una relación señal/ruido (S/N) máxima próxima a 500, es mayor que a pH 9,5 y 10 con una S/N máxima en torno a 350. Este hecho podría estar relacionado con la absorbancia de fondo proveniente de la morfolina en el BGE y que podría ser dependiente del pH, como consecuencia del grado de ionización. Finalmente, la resolución es el último efecto para el que se estudió la influencia del pH en la separación. Se observó que es mayor a pH 8,5 o 9,0 que a 9,5 y considerablemente mayor que a pH 10, lo cual es consistente con la idea que las diferencias entre isoformas se hacen más notables a medida que el pH se acerca al pI. A pH 9,0 y 8,5, a pesar de que el EOF sea menor a pH 8,5, la resolución es muy similar en ambos casos, debido probablemente al ligero ensanchamiento de los picos que se produce a pH 8,5, fundamentalmente en las isoformas con mayor t_m . Adicionalmente, la mayor resolución a pH 9,0 respecto a valores más altos, permite la detección de una novena isoforma en el extremo de t_m mayor. En conclusión, se seleccionó pH 9,0 como valor más adecuado para la separación.

La última etapa en la optimización del método consistió en aumentar la concentración de morfolina en el BGE, ya que un recubrimiento del capilar más efectivo podría ayudar a aumentar la resolución entre las diferentes isoformas. En la Figura 1.6 se muestran dos separaciones de isoformas de PSA comparando dos BGE con concentraciones de 50 y 75 mM de morfolina, manteniendo el resto de condiciones constantes. Como se puede ver, se produce un aumento en el t_m del EOF indicando un recubrimiento más efectivo cuando la concentración de morfolina en el BGE aumenta a 75 mM (Figura 1.6b). De forma similar a lo que ocurre con el estudio del pH, la sensibilidad es ligeramente inferior para una concentración de 75

mM de morfolina. Además, también de forma similar a lo que ocurre con el resto de parámetros modificados en el BGE, cuando aumenta el t_m del EOF, aunque el t_m de los picos de PSA aumenta, la resolución no se vio prácticamente alterada cuando se aumentó la concentración de morfolina en el BGE. Esto puede ser debido igualmente al ligero ensanchamiento que sufren todos los picos de PSA. Este ensanchamiento, además de ser causado por la disminución en la magnitud del EOF, también podría ser debido a un incremento en la corriente de separación, de 24 a 41 μA cuando se aumenta de 50 a 75 mM la concentración de morfolina, hecho que se produce también cuando aumenta la concentración de sales en el BGE o se disminuye su pH, aumentando la proporción de morfolina ionizada.

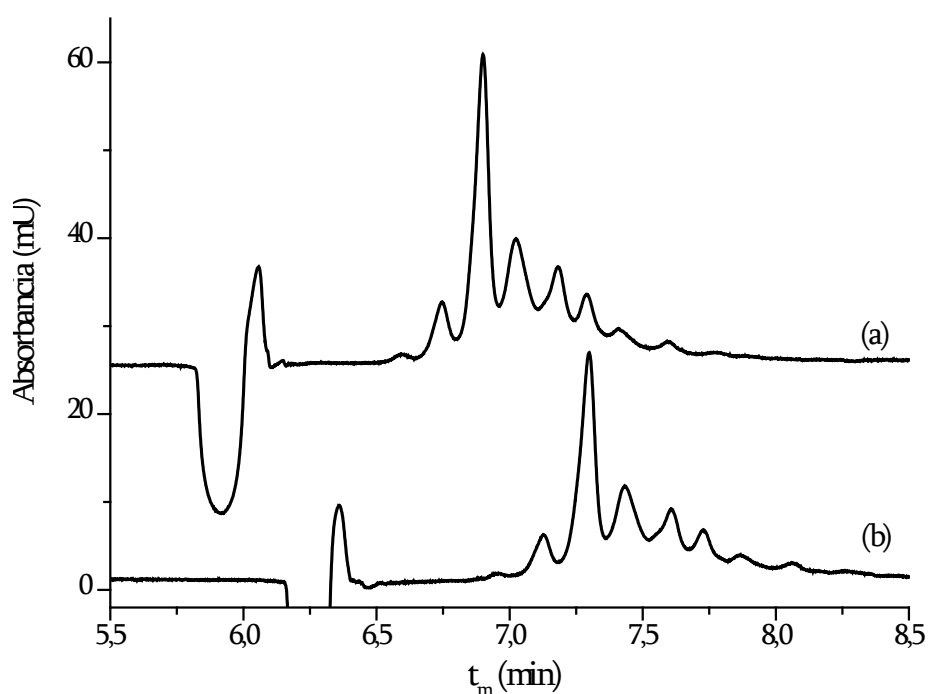


Figura 1.6. Efecto de la concentración de morfolina en el BGE sobre la separación por CZE de isoformas de PSA 1 mg/ml. BGE: dihidrógeno fosfato sódico 10 mM, tetraborato sódico 5 mM y morfolina (a) 50 mM y (b) 75 mM, pH ajustado a 9,0. Resto de condiciones como en Figura 1.3.

1.3.1.2. Repetibilidad y resolución del método de CZE para la separación de isoformas de PSA

Como resultado de estos ensayos, las condiciones óptimas en términos de sensibilidad y resolución correspondieron a un BGE de composición tetraborato sódico 5 mM, dihidrógeno fosfato sódico 10 mM y morfolina 50 mM ajustado a pH 9,0. Estas condiciones permitieron la resolución de 9 isoformas de PSA 1 mg/ml en menos de 8 minutos y con una relación S/N de 18 para el pico minoritario (número 9 en la Figura 1.5).

En la Tabla 1.1 se muestran los valores medios (M) de t_m y porcentaje de área corregida (%A_{corr}) para cada una de las isoformas de PSA, así como los valores de RSD para cada uno de los dos parámetros, en análisis realizados en un mismo día (intra-día) y en días diferentes (inter-día) utilizando este método de CZE con morfolina como recubrimiento dinámico del capilar.

Tabla 1.1. Repetibilidad intra- e inter-día (n=3 en ambos casos) para los valores de t_m y porcentaje de área corregida (%A_{corr}) para las distintas isoformas de PSA resueltas por CZE, empleando morfolina 50 mM como recubrimiento del capilar. Condiciones de análisis como en Figura 1.5c.

Isoforma	Intra-día				Inter-día			
	t_m		%A _{corr}		t_m		%A _{corr}	
	M (min)	RSD (%)	M (%)	RSD (%)	M (min)	RSD (%)	M (%)	RSD (%)
1	6,19	0,4	0,99	5,5	6,26	1,2	0,95	5,5
2	6,31	0,4	7,85	2,2	6,39	1,3	7,57	3,7
3	6,45	0,4	39,17	0,2	6,54	1,4	37,90	3,0
4	6,57	0,4	19,89	0,9	6,66	1,5	20,90	4,8
5	6,72	0,4	15,30	0,6	6,82	1,5	14,68	4,0
6	6,80	0,3	8,30	0,8	6,90	1,5	8,63	3,5
7	6,92	0,3	5,06	0,8	7,03	1,6	5,50	8,8
8	7,09	0,4	2,85	2,0	7,20	1,6	3,21	8,4
9	7,28	0,4	0,59	4,9	7,39	1,6	0,66	12,4

Los valores de RSD para el t_m obtenidos en análisis intra-día, entre 0,3-0,4, e inter-día, entre 1,2-1,6, son comparables con los valores que se describen en la bibliografía, entre 0,4-2%, para otras glicoproteínas analizadas por CE [10, 26, 30, 31].

El valor de $\%A_{corr}$ para las diferentes isoformas fue elegido como parámetro de cuantificación, ya que ha demostrado ser adecuado para el estudio de otra glicoproteína, AGP, como biomarcador [32-34]. La precisión obtenida para este parámetro fue similar o incluso mejor que la descrita en la bibliografía para el análisis por CE de otras proteínas [5, 31, 35]. Los valores de RSD para análisis intra-día variaron entre 0,2-5,5%, siendo mayor de 2,2% únicamente para las dos isoformas minoritarias. En el caso de análisis inter-día los valores de RSD variaron entre 3,0-12,4% y, aunque estos valores tienen una mayor dispersión entre isoformas que los obtenidos intra-día, los valores más altos siguen siendo para las isoformas que presentan menor porcentaje.

La resolución para las distintas isoformas de PSA en la separación por CZE empleando el mismo método optimizado, se muestra a continuación en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Valores de resolución (obtenidos mediante la ecuación I.7) en la separación por CZE de las diferentes isoformas de PSA empleando morfolina como recubrimiento dinámico del capilar. Condiciones de análisis como en Figura 1.5c.

Isoforma	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	R_{s1}	R_{s2}	R_{s3}	R_{s4}	R_{s5}	R_{s6}	R_{s7}	R_{s8}	
	1,28	1,23	0,82	0,96	0,73	0,74	0,98	1,14	

Como se puede observar en la Tabla 1.2, los mayores valores de R_s se obtienen para las isoformas con menor o con mayor t_m , que podrían corresponderse con las más básicas o más ácidas. Sin tener en cuenta el peso molecular, la distribución de isoformas debería estar controlada por la composición del azúcar en cada forma

molecular de PSA, aportando diferencias en la carga global de las isoformas. Las diferencias en μ_{ap} debidas al glicano serán producidas mayoritariamente por el número de unidades de ácido siálico en cada isoforma de PSA, que es el monosacárido que aporta carga eléctrica a la molécula, aunque también se debe considerar el aporte de carga negativa que se produzca en cada isoforma debido a la formación de complejos entre el anion tetraborato y los grupos 1,2-diol de los azúcares de la glicoproteína.

1.3.1.3. Efecto de la desglicosilación de PSA sobre el perfil de isoformas obtenido por CZE

En un intento de identificar cuáles de las isoformas corresponden a moléculas de PSA glicosilada, se sometió el PSA a incubación con un enzima glicosidasa, la péptido-N-glicosidasa F o PNGasa F, uno de los enzimas más usados en la desglicosilación de glicoproteínas. La PNGasa F rompe el enlace amida que une la cadena de oligosacárido a la cadena polipeptídica a través de los residuos de Asn. Para llevar a cabo la incubación, se añadieron 2 unidades del enzima a una disolución de PSA patrón 0,5 mg/ml en bicarbonato amónico 20 mM a pH 8,0 y se mantuvo la reacción a 37°C durante 24 horas. Como control, se aplicaron las mismas condiciones a una solución de glicoproteína sin el enzima. Después de la incubación, el control y el producto de desglicosilación se analizaron por CZE utilizando el método previamente optimizado con morfolina en el BGE. Además, una alícuota de ambos, control y producto de desglicosilación, se analizaron por SDS-PAGE para comprobar el grado de desglicosilación. En la Figura 1.7 se muestra la separación en gel de ambas alícuotas.

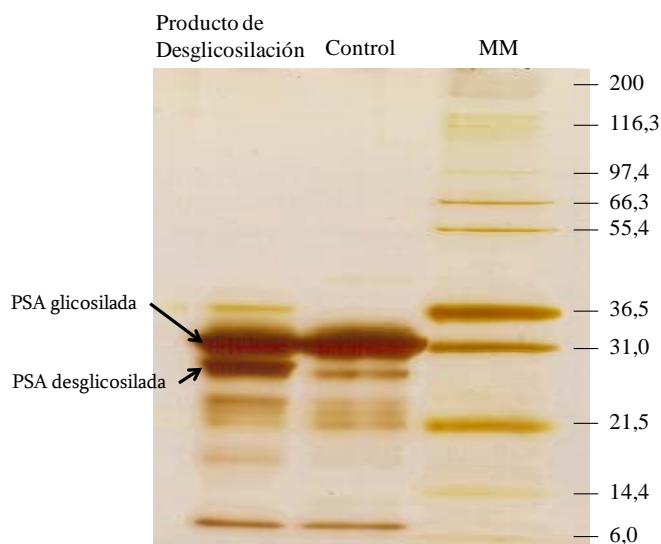


Figura 1.7. SDS-PAGE del producto de desglicosilación de PSA con PNGasa F y la solución control. 5 μ g de PSA por calle. A la derecha del gel, separación de marcadores de peso molecular (MM).

Para el PSA control, se pueden ver una serie de bandas con una mayoritaria próxima a 30 kDa, que correspondería con el PSA glicosilado y justo debajo, otra banda poco intensa que podría corresponder con el PSA desglicosilado que se encontrara en el patrón en una pequeña proporción, como se podría deducir observando la separación correspondiente a la desglicosilación del PSA. En efecto, la calle correspondiente al producto de desglicosilación muestra como esta pequeña banda crece en intensidad y la banda correspondiente al PSA glicosilado disminuye ligeramente en intensidad, indicando que se ha producido una desglicosilación parcial. Para realizar una desglicosilación efectiva, las glicoproteínas suelen tratarse con una solución desnaturalizante antes de llevar a cabo la incubación con el enzima. Sin embargo, ese tratamiento afecta a la estructura de la glicoproteína, modificando el perfil de CE del PSA en nuestro caso, e impidiendo la resolución de las distintas isoformas. Este efecto se puede observar en la Figura 1.8, donde se muestra la separación de isoformas de PSA control comparada con el análisis por CZE de una alícuota de PSA tratada con una solución de 2-mercaptoetanol 25 mM y β -d-octilglucopiranosido al 0,5%, empleada para la ruptura de los puentes disulfuro

de las proteínas y el impedimento, por parte del tensioactivo, del posterior replegamiento de la proteína. Como se puede ver, el tratamiento con la solución desnaturizante provoca la pérdida total de resolución de las isoformas de PSA, con lo que no podrían evaluarse las diferencias entre proporciones de isoformas tras el proceso de desglicosilación.

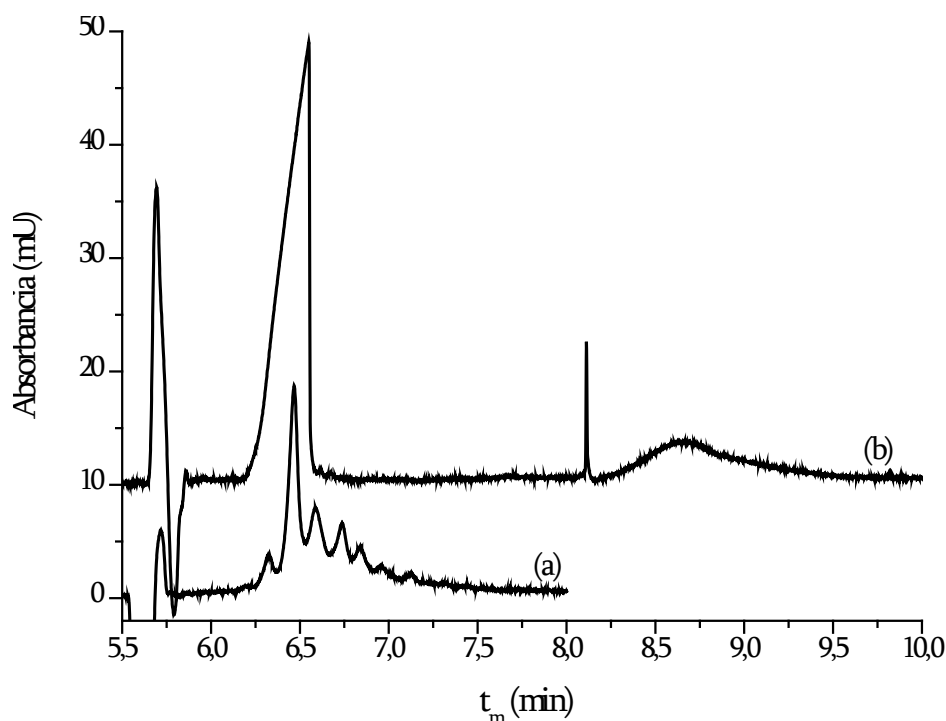


Figura 1.8. Análisis por CZE de PSA 0,5 mg/ml en bicarbonato amónico 20 mM (a) PSA nativa y (b) PSA desnaturizada con una solución de 2-mercaptoetanol 25 mM y β -d-octilglucopiranosido al 0,5% durante 10 minutos a 90°C. Condiciones de análisis como en Figura 1.5c.

Por tanto, al no poderse intentar una desglicosilación total de PSA, se compararon por CZE el PSA parcialmente desglicosilado y el PSA control (Figura 1.9). A simple vista, parece que no existen diferencias entre ambas alícuotas, sin embargo, hay algunos ligeros cambios en las proporciones de isoformas. Las diferencias más marcadas se producen en las isoformas 2, 4, 5 y 8 para las cuales se obtuvieron proporciones medias estadísticamente diferentes tras la desglicosilación. Las proporciones para el PSA parcialmente desglicosilado de las isoformas 2 y 4

aumentan en algo más de un 1% y un 2%, respectivamente, mientras que las isoformas 5 y 8 disminuyen su proporción en aproximadamente un 2% y un 1%, respectivamente. El resto de isoformas no presentan diferencias estadísticamente significativas tras el proceso de desglicosilación.

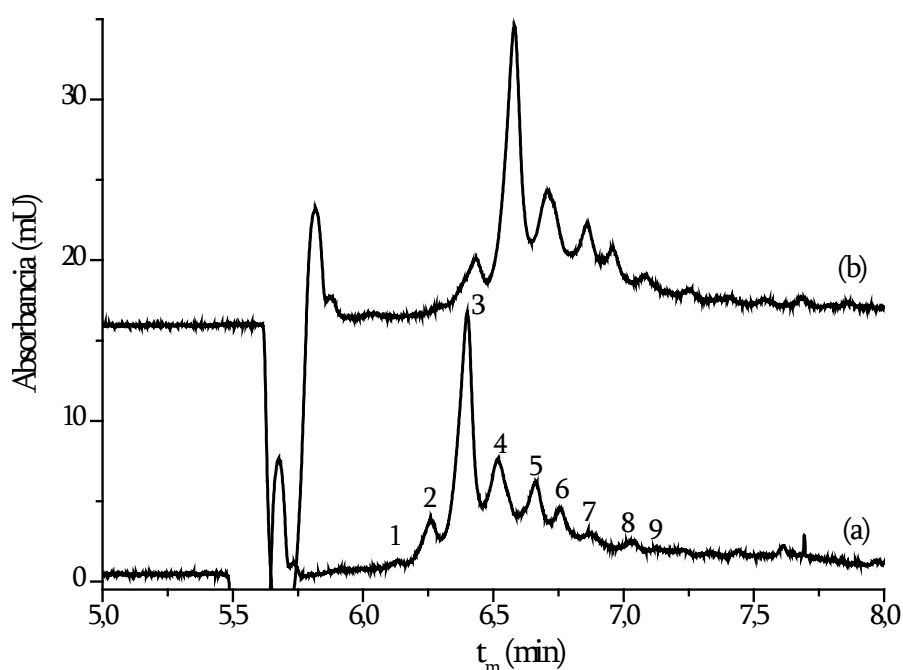


Figura 1.9. Separación por CZE de isoformas de PSA 0,5 mg/ml en bicarbonato amónico 20 mM. (a) PSA control de desglicosilación, (b) producto de desglicosilación de PSA con PNGase F. Condiciones de análisis como en Figura 1.5c.

La disminución en las proporciones de las isoformas 5 y 8 podría indicar la presencia en éstas de mayor abundancia de formas moleculares del PSA glicosilado. Las isoformas 2 y 4, que aumentan ligeramente sus proporciones, podrían contener formas moleculares con menor grado de glicosilación. Sin embargo, la desglicosilación incompleta y el que las variaciones entre las dos muestras sean próximas a las variaciones propias del método, no permiten extraer conclusiones claras del experimento. La desglicosilación completa se intentó llevar a cabo alargando el tiempo de incubación pero, después de 72 horas, las alícuotas de PSA no pudieron ser analizadas por CZE debido probablemente a una degradación o

adsorción al vial por parte de la glicoproteína. Para elucidar la composición de las diferentes isoformas de PSA separadas por CZE, se requeriría una técnica de análisis estructural, como por ejemplo MS.

1.3.2. Empleo de polímeros hidrófilos como recubrimientos del capilar

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, las sustancias poliméricas se han empleado extensamente para el recubrimiento de la pared del capilar en separaciones por CE. Los diferentes tipos de polímeros empleados son muy numerosos, pudiéndose clasificar en base a su carga eléctrica como aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos o neutros [15]. En el presente estudio se han empleado dos polímeros neutros hidrófilos, que ya han sido utilizados previamente como recubrimientos del capilar en separaciones de proteínas por CE: la MHEC y el PEO [36, 37]. Los polímeros hidrófilos, como es el caso de estos dos, sufren adsorción sobre la sílice en el capilar, fundamentalmente por formación de puentes de hidrógeno. La estabilidad de esta interacción dependerá en gran medida de la longitud de la cadena del polímero. En la Figura 1.10 se puede ver la estructura química de estos compuestos. Ambos polímeros fueron añadidos al BGE previamente optimizado con morfolina como recubrimiento dinámico del capilar, en sustitución de ésta. Las concentraciones utilizadas en el BGE fueron 0,05% en el caso de la MHEC y 0,2% para el PEO, las cuales están descritas como concentraciones suficientes para ser efectivas, mientras que concentraciones superiores parecen tener efectos muy similares en cuanto a reducción del EOF y eficacia en la separación [36, 37].

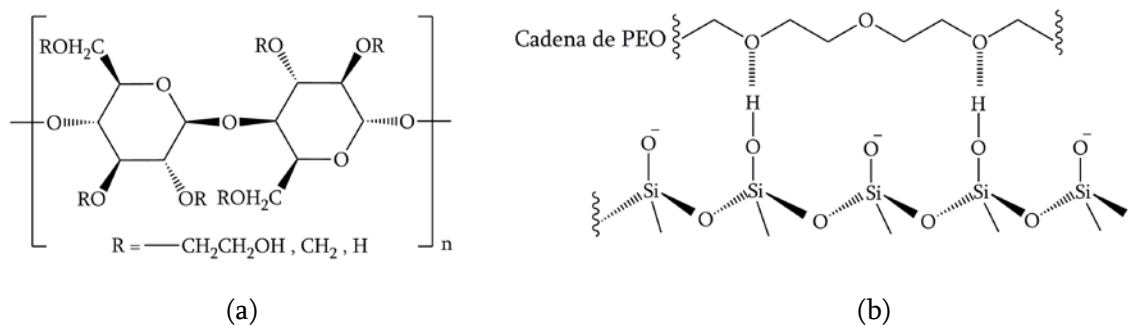


Figura 1.10. (a) Estructura de la metil-hidroxiethyl celulosa (MHEC); (b) Estructura del óxido de polietileno (PEO) y representación esquemática de su adsorción sobre los grupos silanol en la sílice del capilar [36].

Además, el PEO fue utilizado en un procedimiento diferente del anterior que consistió en la adsorción del polímero a la pared del capilar previamente a la separación electroforética. Para ello, el capilar se acondicionó a presión de 1 bar durante 5 minutos con HCl 1M y a continuación se hizo pasar durante 10 minutos, también a 1 bar, una disolución de PEO al 0,2% en HCl 0,1 M. Después, se hizo pasar por el capilar una corriente de aire a 1 bar y 60°C durante 15 minutos, para completar la adsorción del polímero y, finalmente, antes de la separación, se acondicionó el capilar con el BGE, que consistió en dihidrógeno fosfato de sodio 10 mM y tetraborato sódico 5 mM ajustado a pH 9,0.

En la Figura 1.11 se pueden observar las separaciones por CZE de las diferentes isoformas de PSA para ambos polímeros. La separación con MHCE (Figura 1.11a), muestra unos t_m ligeramente menores y un perfil de isoformas con una resolución visiblemente menor que la producida con morfolina en las mismas condiciones (Figura 1.5c). Este hecho podría indicar que ha habido una menor eficacia en el recubrimiento del capilar empleando este polímero que cuando se emplea morfolina añadida al BGE. En el caso del PEO, cuando éste se aplica antes de la separación electroforética, los t_m son muy similares a los obtenidos con morfolina 50 mM en el BGE (Figura 1.5c). Sin embargo, la resolución es ligeramente menor (Figura 1.11c). En el caso en que el PEO está añadido al BGE, los t_m aparecen algo más retrasados (Figura 1.11b) que cuando se emplea morfolina, indicando en este

caso una efectividad de recubrimiento algo superior a la de la morfolina. Respecto a la resolución, los valores obtenidos cuando se añade PEO al BGE se encuentran en el intervalo 0,71-1,32. Pese a la disminución que experimenta el EOF, los valores de resolución son muy similares, incluso algo inferiores a los obtenidos con morfolina en el BGE, sobre todo en las isoformas minoritarias.

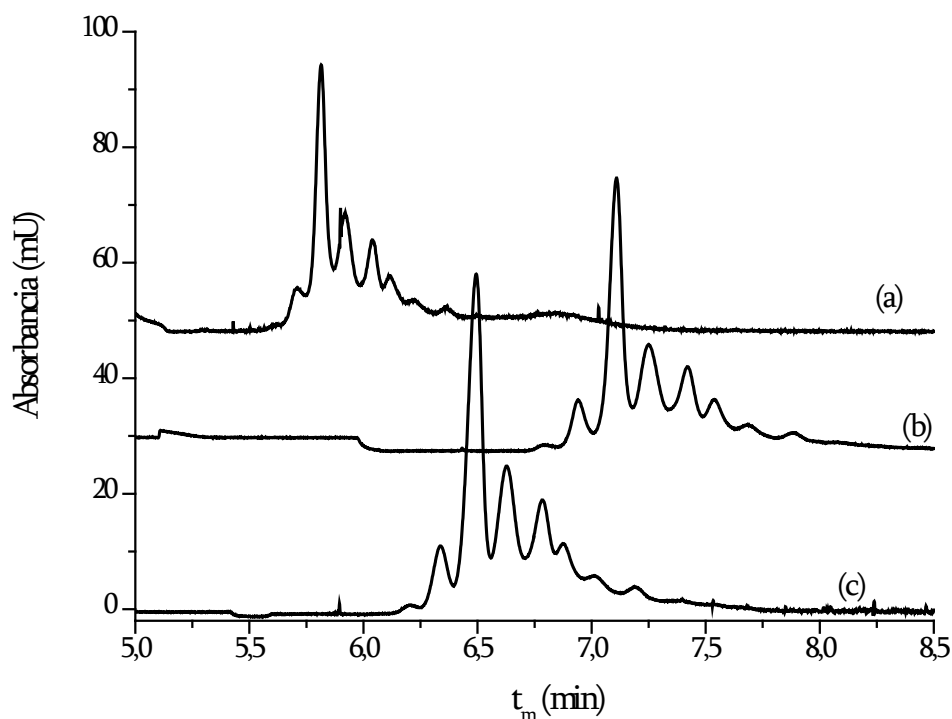


Figura 1.11. Análisis por CZE de isoformas de PSA, empleando polímeros hidrófilos como recubrimientos del capilar. (a) BGE: dihidrógeno fosfato de sodio 10 mM, tetraborato sódico 5 mM y MHEC 0,05%, pH 9,0 (b) BGE: dihidrógeno fosfato de sodio 10 mM, tetraborato sódico 5 mM y PEO 0,2%, pH 9,0 (c) PEO 0,2% en HCl 0,1 M aplicado antes de la separación, BGE: dihidrógeno fosfato de sodio 10 mM y tetraborato sódico 5 mM, pH 9,0. Resto de condiciones como en la Figura 1.5c.

En conclusión, el empleo de MHEC o PEO como recubrimientos del capilar para la separación de isoformas de PSA, parece no aportar ninguna ventaja sobre el empleo de morfolina para evitar adsorción de la glicoproteína a la pared del capilar, ya que si bien el PEO añadido al BGE produce unos resultados similares, su empleo resulta más tedioso debido a la dificultad para solubilizar el polímero en el BGE.

1.3.3. Empleo de bromuro de decametonio como recubrimiento dinámico del capilar

Como se comentó en la introducción de este capítulo, las diaminas, como la putrescina, se emplean como recubrimientos dinámicos del capilar en separaciones de proteínas por CZE. La razón de su eficacia se debe fundamentalmente a dos factores. Por una parte, la bifuncionalidad que aportan los dos grupos amino terminales cargados positivamente. Por otra, la longitud de la cadena alifática, que en función del número de átomos de carbono permite una adsorción rápida y estable del compuesto a la superficie de sílice en el capilar. Sin embargo, la eficacia de las diaminas como recubrimiento del capilar se ve afectada por el pH de la separación ya que éste determinará el grado de protonación, especialmente en separaciones por CZE de proteínas a pH básico. Una alternativa estudiada en estos casos ha sido el empleo de compuestos con grupos amonio cuaternario [16], que mantienen la carga positiva en todo el intervalo de pH y, por tanto, su eficacia como recubrimiento del capilar no se ve afectada por el valor del pH del BGE. En la Figura 1.12 se comparan las estructuras de la putrescina y el bromuro de decametonio, una sal de amonio cuaternario.

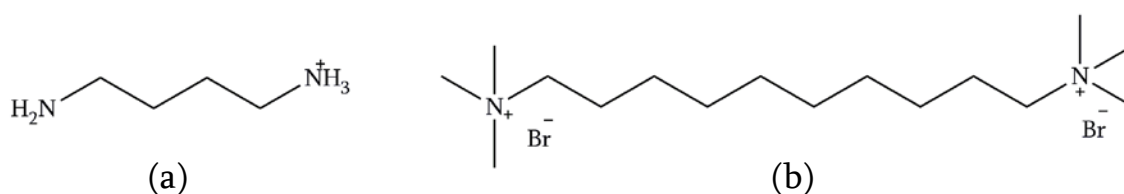


Figura 1.12. (a) Estructura de la putrescina parcialmente cargada. (b) Estructura del bromuro de decametonio.

1.3.3.1. Efecto de la concentración del aditivo en el BGE sobre la separación de isoformas de PSA por CZE

Dados estos antecedentes, se decidió emplear el bromuro de decametonio como aditivo en el BGE para el estudio de isoformas de PSA por CZE. Además, este

compuesto carece de grupos amino primarios, lo que encaja con el objetivo de desarrollar métodos de CE compatibles con la derivatización fluorescente en-capilar de PSA a través de sus grupos amino. Para ello, partiendo del BGE optimizado para el empleo de morfolina, se sustituyó ésta por la sal de amonio cuaternario, probándose en un intervalo de concentración entre 1-10 mM de ésta. En la Tabla 1.3 se presentan los valores de μ_{EOF} obtenidos a las diferentes concentraciones del aditivo en comparación con los obtenidos para la morfolina.

Tabla 1.3. Valores de μ_{EOF} obtenidos para los análisis por CZE sin aditivo y con morfolina o bromuro de decametONIO a diferentes concentraciones en el BGE. BGE: dihidrógeno fosfato de sodio 10 mM, tetraborato sódico 5 mM y el aditivo correspondiente ajustado a pH 9,0. Resto de condiciones como en Figura 1.5c.

Aditivo en el BGE	$\mu_{EOF} \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Sin aditivo	8,2
Morfolina 50 mM	6,5
Morfolina 75 mM	5,9
Bromuro de decametONIO 1 mM	4,3
Bromuro de decametONIO 2 mM	3,4
Bromuro de decametONIO 3.5 mM	2,8
Bromuro de decametONIO 5 mM	2,6
Bromuro de decametONIO 7 mM	2,4
Bromuro de decametONIO 10 mM	2,0

La mayor eficacia de este aditivo frente a la morfolina en la reducción de la magnitud del EOF, se puede observar ya para una concentración de decametONIO de tan sólo 1 mM. Para una concentración aproximadamente siete veces menor de

decametonio que de morfolina (75 mM de morfolina frente a 10 mM de decametonio en el BGE), la μ_{EOF} se reduce casi en un 70%.

En la Figura 1.13 se pueden observar las separaciones de isoformas de PSA por CZE, empleando el bromuro de decametonio a diferentes concentraciones en el BGE como recubrimiento dinámico del capilar.

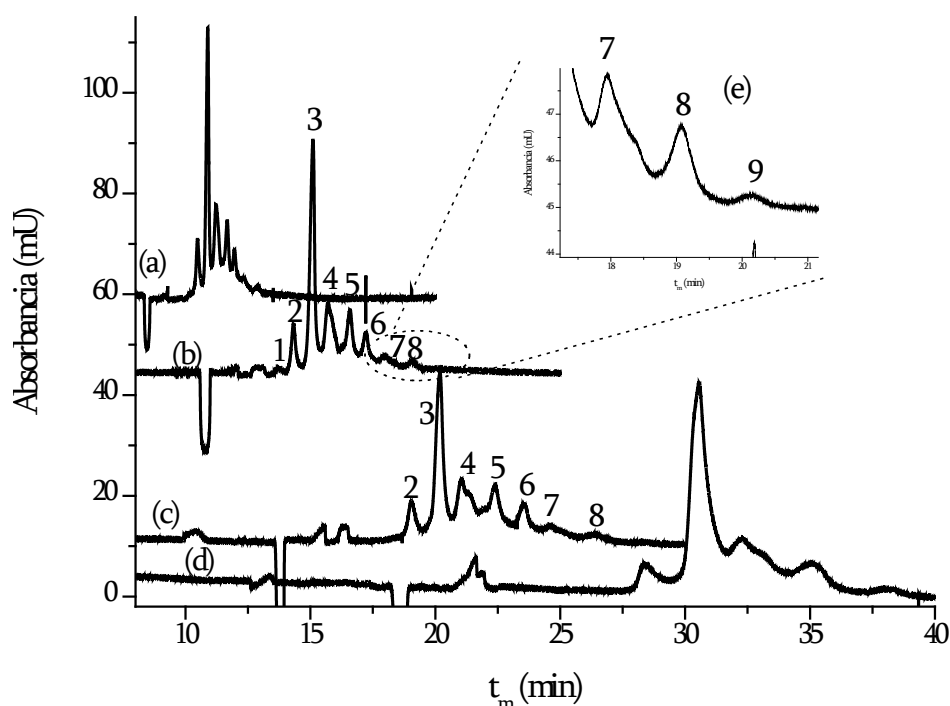


Figura 1.13. Efecto de la concentración de bromuro de decametonio en el BGE sobre la separación por CZE de isoformas de PSA 1 mg/ml. BGE: dihidrógeno fosfato sódico 10 mM, tetraborato sódico 5 mM y bromuro de decametonio (a) 1 mM, (b) 2 mM, (c) 5 mM y (d) 10 mM, pH ajustado a 9,0; (e) zoom de (b) para las isoformas de mayor t_m . Resto de condiciones como en la Figura 1.5c.

A medida que se aumenta la concentración del aditivo, se puede apreciar claramente el aumento en el t_m del EOF así como de las isoformas del PSA. Del mismo modo se puede ver el ensanchamiento progresivo de los picos con la concentración de decametonio. También se puede observar el aumento en la resolución que se produce sobre el perfil al pasar de una concentración 1 mM a 2 mM del aditivo (Figuras 1.13a y b). Así mismo, resulta evidente el ensanchamiento

de las isoformas de PSA que se produce a una concentración 5 mM de decametONIO (Figura 1.13c), concentración que provoca además la pérdida de la primera isoforma. Por otro lado, un efecto adicional que se puede observar a esta concentración del aditivo, que ya se observa a una concentración del mismo de 3,5 mM (no mostrada), es el desdoblamiento de la isoforma número 4. Este desdoblamiento podría indicar la presencia de otra forma molecular del PSA que por disminución de la μ_{EOF} comienza a separarse, aunque a una concentración mayor del aditivo, de 10 mM, tampoco llega a resolverse claramente. Este efecto, aunque denote la presencia de nuevas formas moleculares, es indeseable pues dificulta la cuantificación y la obtención de las proporciones de isoformas del PSA para su posterior evaluación como posible biomarcador. Finalmente, para una concentración de 10 mM del aditivo, únicamente 5 isoformas de PSA pueden ser detectadas con una eficacia muy disminuida (Figura 1.13d). En la Figura 1.13e se muestra una ampliación de escala para las isoformas de mayor t_m en la separación con decametONIO 2 mM, donde se puede ver la resolución de la novena isoforma.

En la Tabla 1.4 se han recogido los valores de la resolución entre las diferentes isoformas del PSA, obtenidos mediante la ecuación I.7. Para una concentración de 1 mM de decametONIO la resolución es, excepto para las dos primeras isoformas, ligeramente mayor que para morfOLINA 50 mM (Tabla 1.2). Para una concentración de 2 mM la resolución es considerablemente mayor respecto a la separación con morfOLINA, siendo más significativas las diferencias para la separación entre las isoformas 2 y 3 y las isoformas 7 y 8. Para concentraciones mayores de 2 mM de decametONIO los valores de resolución vuelven a disminuir como se puede apreciar en la Tabla 1.4 para una concentración del aditivo 3,5 mM, aunque son superiores, excepto para los dos primeros picos, a los obtenidos con morfOLINA 50 mM en el BGE.

Tabla 1.4. Valores de resolución obtenidos para el análisis de isoformas de PSA por CZE empleando diferentes concentraciones de bromuro de decametONIO en el BGE. BGE: dihidrógeno fosfato de sodio 10 mM, tetraborato sódico 5 mM y bromuro de decametONIO ajustado a pH 9,0. Resto de condiciones como en la Figura 1.5c.

Isoforma	1	2	3	4	5	6	7	8
Concentración de decametONIO	R_{s1}	R_{s2}	R_{s3}	R_{s4}	R_{s5}	R_{s6}	R_{s7}	
1 mM	1,01	1,52	1,02	1,07	0,73	0,77	1,20	
2 mM	1,42	1,89	0,99	1,19	0,91	0,86	1,24	
3,5 mM	0,91	1,63	0,92	1,02	0,89	0,79	1,18	

La menor resolución obtenida para concentraciones mayores de 2 mM de decametONIO, pese a la disminución en la magnitud del EOF, es debida probablemente al ensanchamiento de los picos que se produce cuando se aumenta la concentración del aditivo. Por otro lado, la isoforma número 9, detectada con el recubrimiento de morfolina en el BGE no se resolvió adecuadamente con el bromuro de decametONIO, a pesar del aumento en la resolución respecto a la morfolina. Esta isoforma con mayor t_m , en el caso del recubrimiento con bromuro de decametONIO, presentó en todos los casos una S/N inferior a 10, por debajo del límite de cuantificación (Figura 1.13e).

1.3.3.2. Repetibilidad del método

A continuación se procedió a probar la repetibilidad del método de CZE con bromuro de decametONIO a una concentración de 2 mM en el BGE, puesto que fue la concentración que proporcionó los mejores valores de resolución para todas las isoformas. En la Tabla 1.5 se muestran, igual que para el método con morfolina (Tabla 1.1), los datos de repetibilidad intra- e inter-día obtenidos para t_m y $\%A_{corr}$ de las distintas isoformas de PSA separadas por CZE empleando bromuro de

decametONIO como recubrimiento dinámico del capilar. Los datos obtenidos son ligeramente mejores que los publicados inicialmente [38]. Los valores de RSD para t_m son ligeramente menores para análisis en un mismo día en el caso de bromuro de decametONIO, respecto a los análisis realizados con morfolina. Por otro lado, los mismos valores empleando bromuro de decametONIO son algo peores para análisis en días diferentes comparado con el método con morfolina. Sin embargo, en ambos casos siguen siendo comparables a los datos publicados en la bibliografía para otras proteínas. En general, los valores de RSD obtenidos para $\%A_{corr}$, tanto intra- como inter-día, son menores que para la separación con morfolina, especialmente para las isoformas minoritarias.

Tabla 1.5. Repetibilidad intra- e inter-día (n=3 en ambos casos) para los valores de t_m y porcentaje de área corregida ($\%A_{corr}$) para las distintas isoformas de PSA resueltas por CZE, empleando bromuro de decametONIO 2 mM como recubrimiento del capilar. Condiciones de análisis como en la Figura 1.13b.

Isoforma	Intra-día				Inter-día			
	t_m		$\%A_{corr}$		t_m		$\%A_{corr}$	
	M (min)	RSD (%)	M (%)	RSD (%)	M (min)	RSD (%)	M (%)	RSD (%)
1	13,01	0,3	1,57	1,4	13,61	1,5	1,53	1,1
2	13,54	0,3	9,00	0,4	14,20	1,9	8,92	3,5
3	14,23	0,3	39,16	0,3	14,96	2,1	38,37	2,4
4	14,76	0,3	20,05	0,3	15,54	2,2	20,06	0,6
5	15,54	0,2	14,85	0,2	16,40	2,4	15,46	2,5
6	16,09	0,3	8,75	0,6	17,02	2,5	8,63	3,9
7	16,72	0,2	4,55	1,6	17,72	2,7	4,91	6,4
8	17,69	0,3	2,07	3,8	18,81	2,8	2,13	4,7

1.3.3.3. Efecto del SDS sobre la separación de isoformas de PSA por CZE

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, la derivatización fluorescente para el análisis por CE-LIF resulta una herramienta muy útil para el análisis de proteínas purificadas de muestras biológicas en las que se encuentran a muy baja concentración, como es el caso del PSA en sangre. Sin embargo, cuando se derivatiza una proteína pura a través de los grupos amino, se pueden producir picos múltiples ya que las proteínas suelen tener múltiples restos aminados [39, 40]. La aparición de picos múltiples en la separación por CZE de una proteína derivatizada se puede evitar añadiendo al BGE un tensioactivo aniónico. En este sentido, se han probado con este fin tanto el SPS como el SDS. Por otro lado, en el caso de la separación de las diferentes isoformas de una glicoproteína, la presencia del tensioactivo en el BGE puede impedir la separación de éstas. Este hecho es debido a que las moléculas de tensioactivo, cargadas negativamente, se unen a las moléculas de proteína de forma muy eficiente, imponiendo aproximadamente la misma carga negativa a todas las moléculas de proteína. En el caso de isoformas de glicoproteína, podrían anularse las diferencias existentes, por ejemplo, entre formas moleculares con diferente número de unidades de ácido siálico (grupo que aporta carga negativa a la glicoproteína), migrando todas ellas bajo un mismo pico electroforético. Con el fin de comprobar el efecto del tensioactivo en la separación de isoformas de PSA, se realizó el experimento que se detalla a continuación.

El BGE utilizado para el estudio contenía dihidrógeno fosfato sódico 10 mM, tetraborato sódico 5 mM, bromuro de decametONIO 2 mM y concentraciones variables de SDS entre 0-6 mM, con el pH ajustado a 9,0. Los análisis se realizaron en un capilar con una longitud efectiva de 51 cm, puesto que es la longitud de los capilares comerciales compatibles con la instrumentación disponible en el laboratorio para el análisis por CE-LIF (que se detallará en el Capítulo 3, dedicado al estudio de métodos de derivatización de PSA). En la Figura 1.14 se pueden observar las separaciones de isoformas de PSA a diferentes concentraciones de SDS en el BGE.

Se observa en primer lugar que la separación se ve afectada por la longitud del capilar de separación, obteniéndose unos valores de resolución menores entre las diferentes isoformas (entre 0,74 y 1,37, Figura 1.14a) que cuando el capilar tiene una longitud efectiva de 70 cm (entre 0,86 y 1,89, Figura 1.13b). A pesar de ello, el PSA analizado en este capilar de separación, en ausencia de SDS en el BGE, muestra la separación de las 8 isoformas obtenida previamente para una longitud efectiva mayor (Figura 1.14a). Además, se observa la disminución en el t_m del marcador del EOF, cuando la concentración de SDS en el BGE aumenta. Este hecho podría ser debido a una interacción entre las moléculas del SDS y el decametonio en el BGE, disminuyendo su eficacia para bloquear los grupos silanol de la superficie interior del capilar.

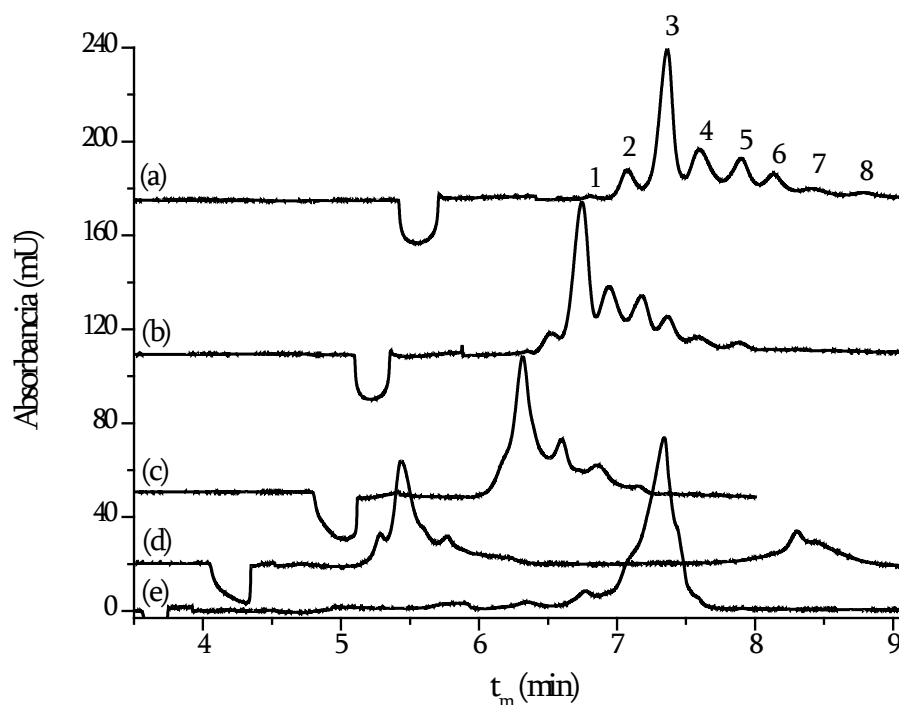


Figura 1.14. Efecto de la concentración de SDS en el BGE sobre la separación por CZE de isoformas de PSA. Concentración de SDS en el BGE (a) 0 mM, (b) 1 mM, (c) 2 mM, (d) 4 mM y (e) 6 mM. Longitud efectiva del capilar de separación 51 cm. Resto de condiciones como en la Figura 1.13b.

El otro efecto que se observa en la Figura 1.14 es el que se produce en la resolución de las isoformas de PSA a medida que aumenta la concentración de SDS. Para una concentración 1 mM de SDS, aún se pueden distinguir todos los picos de PSA, aunque la resolución entre isoformas ha disminuido respecto de la obtenida cuando no hay SDS en el BGE. Para concentraciones mayores de 1 mM, la resolución de las isoformas casi desaparece y únicamente algunos picos de PSA pueden ser resueltos. Finalmente, a una concentración de SDS de 6 mM, la resolución se pierde por completo. Probablemente en estas condiciones el SDS se une a la proteína, imponiendo a todas las isoformas de PSA la misma carga.

Otra observación que se puede destacar es el t_m del perfil de PSA, el cual disminuye con el t_m del EOF hasta una concentración de 4 mM de SDS en el BGE. Sin embargo, cuando la concentración es de 6 mM el pico de PSA se retrasa en gran medida con respecto al EOF (Figura 1.14e). Este cambio en el comportamiento electroforético podría estar relacionado con la formación de micelas de SDS a esta concentración. Si bien la concentración micelar crítica (cmc) del SDS en agua es de aproximadamente 8 mM, ésta puede disminuir cuando se encuentra en presencia de iones sodio [41]. Por ejemplo, para una concentración de 2,5 mM de tetraborato sódico, la cmc del SDS se reduce a 6,4 mM [39], con lo que en el BGE empleado para la separación de PSA por CZE el SDS 6 mM se encuentre probablemente formando micelas. La interacción del PSA con esas micelas podría ser responsable del aumento en el t_m del pico de la glicoproteína.

En definitiva, el uso de SDS no es adecuado para el análisis de isoformas de PSA por CZE a concentraciones mayores de 1 mM en el BGE, ya que a partir de esta concentración la resolución de los picos de PSA se reduce drásticamente.

1.3.4. Empleo de recubrimientos que suprimen el EOF

Se ha observado [8] que ciertos copolímeros de poliacrilamida lineal y acrilamida N-sustituida, se adsorben fuertemente sobre superficies de sílice y se

utilizan por tanto en CE para suprimir o disminuir considerablemente el EOF. Estos productos, comercializados bajo el nombre de UltraTrol LN y EOTrol LN, reducen el EOF en un amplio intervalo de pH, entre 3 y 9, proporcionando valores tan bajos para la μ_{EOF} , del orden de $10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ [8], que se suele decir que suprimen el EOF. La diferencia entre ambos productos es que el UltraTrol LN se aplica previamente a la separación electroforética y no se adiciona al BGE, mientras que el EOTrol LN se añade directamente al BGE. Por esta razón, el empleo del recubrimiento UltraTrol LN proporciona mayor versatilidad, por ejemplo para la compatibilidad con sistemas de detección post-capilar como es el caso de la MS [42]. Según el fabricante, el recubrimiento con UltraTrol LN se adsorbe establemente durante 60 minutos a los capilares de sílice fundida en las condiciones más habituales de separación, y se regenera fácilmente con un lavado con NaOH 1 M para dar análisis reproducibles, por lo que a pH superior a 9 la estabilidad del recubrimiento no está garantizada.

Los recubrimientos UltraTrol LN y EOTrol LN han sido utilizados previamente de forma satisfactoria para el análisis de isoformas de proteínas como Tf y $\alpha 1$ -antitripsina [8]. En el presente trabajo, ambos recubrimientos se aplicaron a la separación de isoformas de PSA por CZE.

1.3.4.1. Empleo de UltraTrol LN en la separación de isoformas de PSA

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se recubrió con UltraTrol LN un capilar de 78,5 cm de longitud (70 cm de longitud efectiva). Como BGE se usó dihidrógeno fosfato de sodio 10 mM y tetraborato sódico 5 mM con el pH ajustado a 9,0. La temperatura del capilar se fijó en 20°C. En estas condiciones, cuando se aplicó un potencial de 25 kV con polaridad positiva, no se observó ningún pico en 60 minutos, lo que indica que la μ_{EOF} era inferior a $5 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, en concordancia con la bibliografía. Tampoco se observó ningún pico en 60 minutos cuando se aplicó el mismo potencial con polaridad negativa al mismo capilar. Estos resultados indican que debido a la supresión del EOF originada por la adsorción de UltraTrol LN, la

migración de los picos de PSA en un capilar de 70 cm de longitud efectiva es demasiado lenta como para poder analizar el PSA en un tiempo razonable.

Con el fin de confirmar esta hipótesis, se utilizó el mismo capilar pero inyectando el PSA en su extremo más corto, de tal forma que en estas condiciones la longitud efectiva de separación era de sólo 8,5 cm. El voltaje aplicado continuó siendo 25 kV y con polaridad positiva. En estas condiciones se consiguieron separar 7 isoformas de PSA en 9 minutos (Figura 1.15a). En esta figura se puede observar cómo las isoformas de PSA migran en sentido inverso al que se obtuvo para los métodos con morfolina y bromuro de decametonio, en los cuales la glicoproteína migra en el sentido del EOF. En el caso del UltraTrol LN, las moléculas migran prácticamente en ausencia de EOF, por lo tanto migrarán únicamente debido a su μ_{ef} y por esa razón las primeras isoformas que se detectan son las de mayor carga o las más ácidas.

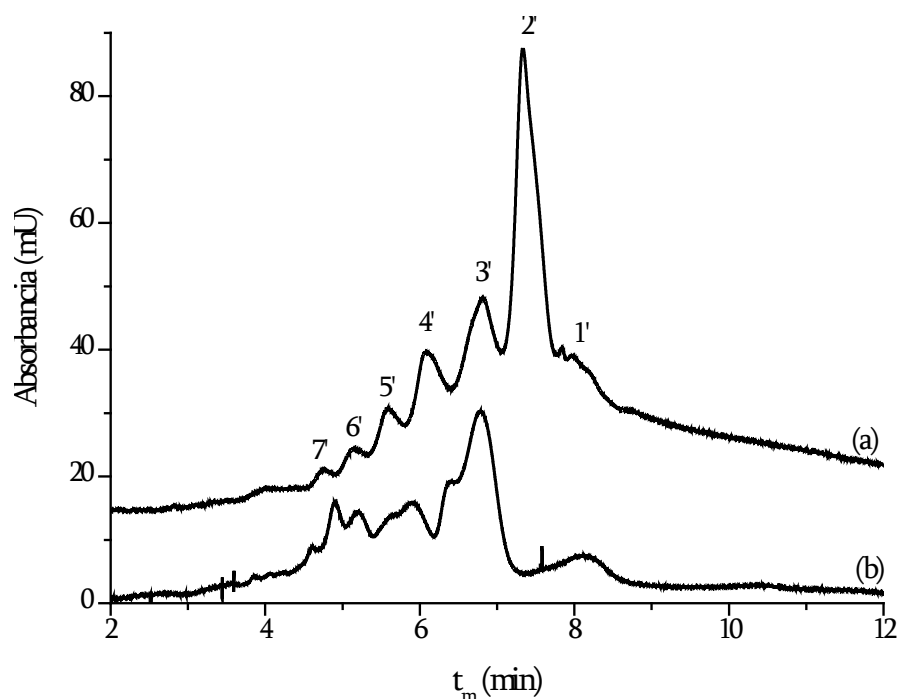


Figura 1.15. Separación por CZE de isoformas de PSA con UltraTrol LN como recubrimiento del capilar. BGE: dihidrógeno fosfato de sodio 10 mM y tetraborato sódico 5 mM, pH ajustado a 9,0. Condiciones de análisis: inyección catódica, 20°C y (a) $l=8,5$ cm ($L=78,5$ cm) con polaridad positiva y (b) $l=25$ cm ($L=33,5$ cm) con polaridad negativa. Resto de condiciones como en la Figura 1.3.

Para intentar mejorar la separación de las isoformas utilizando esta estrategia, se utilizó un capilar de longitud efectiva intermedia entre las dos empleadas hasta este momento. Se llevó a cabo la separación en un capilar de longitud total 33,5 cm (longitud efectiva 25 cm). La separación se realizó a 25 kV en polaridad negativa y se inyectó la muestra en el extremo catódico. En estas condiciones se pudo observar la separación solamente parcial de las isoformas de PSA (Figura 1.15b). Además, se observó también un aumento drástico en la corriente de separación respecto a una longitud efectiva de 70 cm, de 18,5 a 45 μA , debido al gran aumento en el campo eléctrico aplicado, de 320 V/cm a 750 V/cm.

A pesar de la menor resolución obtenida para la longitud efectiva de 25 cm ($L=33,5$ cm) frente a 8,5 cm ($L=78,5$ cm), se decidió continuar el estudio con la longitud total más corta debido al menor tiempo de acondicionamiento del capilar que se requiere, lo cual reduce en gran medida el tiempo total de análisis. A continuación se procedió a modificar la concentración del BGE a fin de tratar de mejorar la resolución de isoformas de PSA. Concretamente, se aumentó la concentración de tetraborato en el BGE entre 5 y 30 mM. En la Figura 1.16 se resumen los resultados obtenidos.

Como se puede ver, la resolución entre las isoformas de PSA aumenta a medida que se incrementa la concentración de tetraborato en el BGE de 5 a 20 mM, al mismo tiempo que el t_m de los picos se adelanta (Figuras 1.16a-c). El ligero incremento en la μ_{ef} que sufren las isoformas de PSA al incrementar la concentración de tetraborato en el BGE, podría estar asociado a una ligera disminución en la magnitud de un EOF residual que perdurara tras el recubrimiento con UltraTrol LN, porque si bien la μ_{EOF} es suficientemente pequeña para no determinar el sentido en que migran las isoformas de PSA ($\mu_{EOF} < \mu_{ef}$), el EOF no está totalmente suprimido con el empleo de este recubrimiento. Otra explicación posible para la disminución del t_m de las isoformas de PSA, a medida que aumenta la concentración de tetraborato en el BGE, podría ser la formación de mayor número de complejos 1,2-

diol de los glicanos de la glicoproteína con el anión tetraborato, lo que le aportaría a las isoformas una mayor carga global negativa.

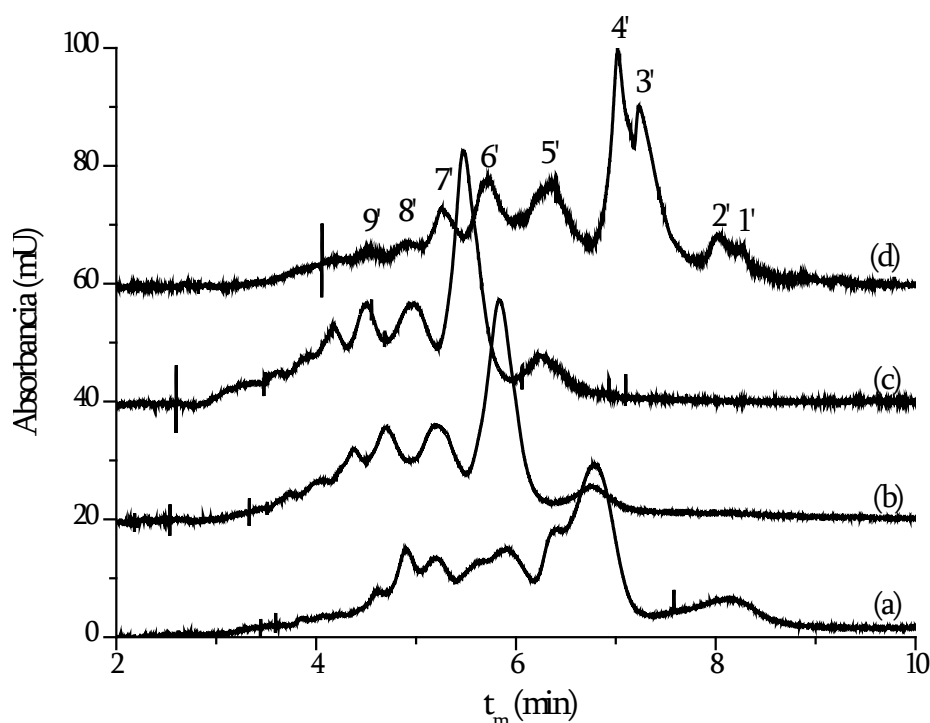


Figura 1.16. Influencia de la concentración del BGE en la separación por CZE de isoformas de PSA, con UltraTrol LN como recubrimiento del capilar. BGE: dihidrógeno fosfato de sodio 10 mM y tetraborato sódico (a) 5 mM, (b) 15 mM, (c) 20 mM y (d) 30 mM, pH ajustado a 9,0. Resto de condiciones como en la Figura 1.15b.

Por otro lado, se produce un drástico aumento en la corriente de separación cuando aumenta la concentración de tetraborato en el BGE. De este modo, cuando la concentración del anión es de 20 mM, la corriente es superior a 100 μA , límite que establece el instrumento como crítico para la atenuación del efecto Joule. En este límite, el potencial de separación disminuye para compensar el aumento de la corriente, por tanto, la separación con 20 mM de tetraborato en el BGE se realizó a -24 kV. El efecto es mucho mayor cuando la concentración de tetraborato se incrementa hasta 30 mM, para la cual el potencial de separación disminuyó a -20 kV, aplicando un campo eléctrico de 597 V/cm. Para esta última concentración, a pesar

de la elevada corriente de separación alcanzada, se produjo la mejor separación de isoformas de PSA, obteniendo la detección de un total de 9 picos en menos de 9 minutos (Figura 1.16d). Aunque las 9 isoformas estén numeradas en orden inverso al de los otros recubrimientos, se han indicado con un superíndice 1'-9' para hacer constar que las isoformas separadas con el UltraTrol LN podrían no corresponderse con las detectadas con el resto de recubrimientos.

A continuación se estudió el efecto del voltaje de separación sobre la resolución de las isoformas de PSA, empleando para ello el BGE conteniendo tetraborato 30 mM. En la Figura 1.17 se muestra la influencia de este parámetro.

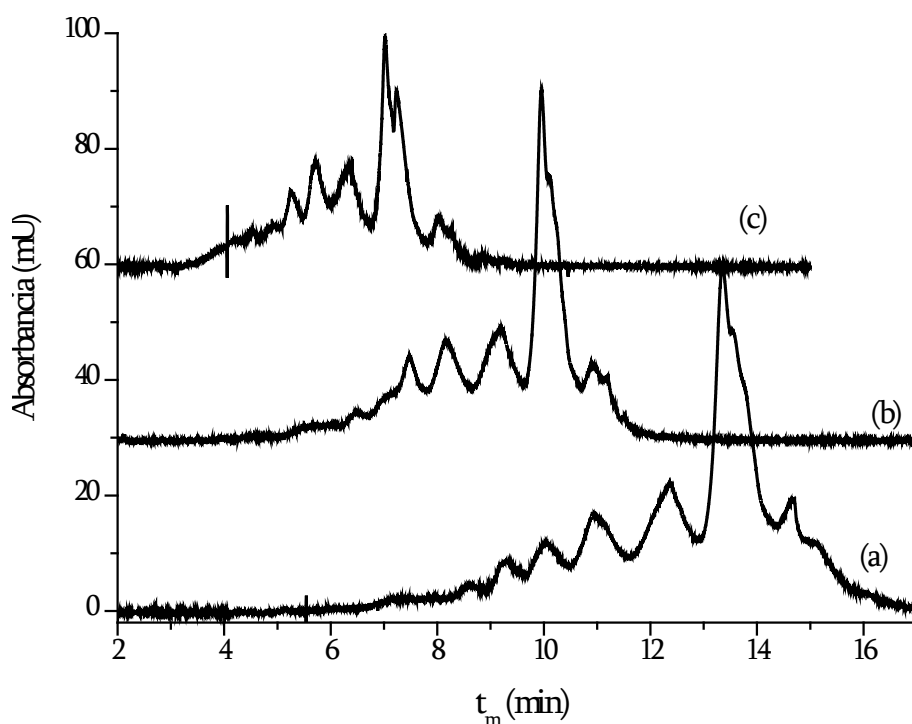


Figura 1.17. Influencia del voltaje en la separación por CZE de isoformas de PSA, con UltraTrol LN como recubrimiento dinámico del capilar. Voltaje de separación (a) -15 kV, (b) -18 kV y (c) -20 kV. Resto de condiciones como en la Figura 1.16d.

La corriente de separación disminuye drásticamente hasta 56 μ A cuando el voltaje de separación se reduce a -15 kV, al mismo tiempo que aumentan los tiempos de migración para los picos de PSA (Figura 1.17a). La eficacia también disminuye a

este potencial, debido probablemente al ensanchamiento que sufren los picos, lo cual podría ser debido a su vez a la disminución del campo eléctrico de 597 V/cm para un potencial de -20 kV hasta 448 V/cm para un potencial de -15 kV. En definitiva, en concordancia con las previsiones teóricas, la mejor resolución, en especial para las isoformas mayoritarias, y el menor tiempo de análisis se obtienen para un potencial de separación de -20 kV.

1.3.4.2. Empleo de EOTrol LN en el BGE como recubrimiento dinámico del capilar

Como se ha comentado anteriormente, este tipo de recubrimiento se adiciona al BGE. Se estudió en primer lugar el efecto de la concentración de EOTrol LN en el BGE sobre la separación de isoformas de PSA por CZE. En la Figura 1.18 se muestran los resultados obtenidos para tres diluciones diferentes de la solución comercial de EOTrol LN 1/20, 1/40 y 1/80, correspondientes a la proporción de dicha solución en el BGE previamente empleado en las separaciones de PSA con UltraTrol LN (dihidrógeno fosfato sódico 10 mM y tetraborato sódico 30 mM, pH 9,0). Los resultados obtenidos son muy similares para las tres concentraciones de EOTrol LN estudiadas. Las corrientes eléctricas en los tres BGE son muy similares aunque, en principio, la viscosidad de los BGE debe ser mayor para las concentraciones mayores del polímero. Esta puede ser la causa del ligero aumento en los t_m que sufren los picos de PSA al pasar de una dilución 1/40 de EOTrol LN a una dilución 1/20. Para la dilución 1/80 los t_m vuelven a aumentar, lo que podría estar relacionado en este caso con un recubrimiento del capilar menos eficaz. A la vista de los resultados, la dilución 1/40 de EOTrol LN en el BGE produce una separación levemente mejor en términos de resolución, aunque por otro lado, el empleo de este recubrimiento no aporta mejora alguna en la resolución frente al uso de UltraTrol LN.

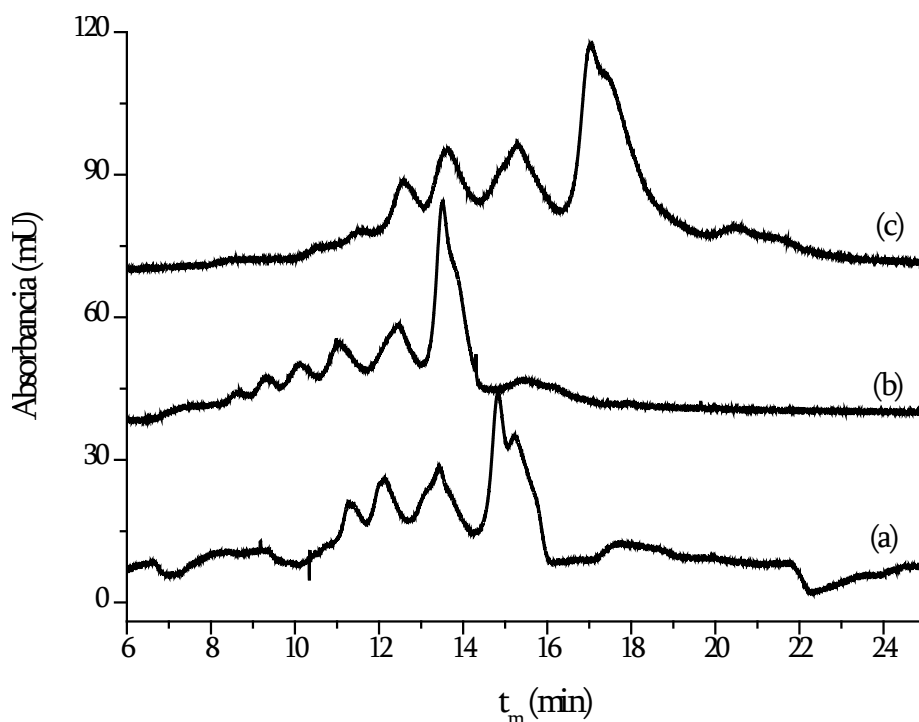


Figura 1.18. Influencia de la concentración de EOTrol en la separación por CZE de isoformas de PSA. Dilución de EOTrol LN en BGE (a) 1/20, (b) 1/40 y (c) 1/80. Resto de condiciones como en la Figura 1.17c.

1.3.4.3. Estudio de repetibilidad con el empleo de UltraTrol LN

Para comprobar la estabilidad del recubrimiento con UltraTrol LN y la repetibilidad del método, se emplearon las mejores condiciones en términos de resolución alcanzadas en el estudio, que permitían la separación de 9 isoformas de PSA en menos de 9 minutos. En concreto, el BGE empleado fue dihidrógeno fosfato de sodio 10 mM y tetraborato sódico 30 mM con pH ajustado a 9,0. Se empleó un capilar con longitud efectiva de separación de 25 cm, un voltaje de 20 kV en polaridad negativa y una temperatura de 20°C. La inyección hidrodinámica de PSA 1 mg/ml se realizó en el extremo del cátodo a 35 mbar durante 30 segundos y la detección UV a 214 nm. En la Tabla 1.6 se muestran los resultados de repetibilidad obtenidos para el método seleccionado con el recubrimiento del capilar con UltraTrol LN.

En general, los valores de RSD, tanto para el t_m como para los $\%A_{corr}$, son mayores que los obtenidos en el caso de los recubrimientos dinámicos con morfolina (Tabla 1.1) o con bromuro de decametONIO (Tabla 1.5). Los valores de RSD más elevados que en el caso de los otros recubrimientos para el t_m podrían deberse a que el recubrimiento de UltraTrol LN, mucho más eficaz en la supresión del EOF que la morfolina y el bromuro de decametONIO, no se regenera perfectamente después de cada análisis. Aún así, la precisión obtenida proporcionó unos valores de RSD para t_m inferiores en todos los casos a 3,4%, valores comparables para otros recubrimientos poliméricos descritos en CE de proteínas [43-45].

Tabla 1.6. Repetibilidad intra- e inter-día (n=3 en ambos casos) para los valores de t_m y porcentaje de área corregida ($\%A_{corr}$) para las distintas isoformas de PSA resueltas por CZE, empleando UltraTrol LN como recubrimiento del capilar. Condiciones de análisis como en la Figura 1.16d.

Isoforma	Intra-día				Inter-día			
	t_m		$\%A_{corr}$		t_m		$\%A_{corr}$	
	M (min)	RSD (%)	M (%)	RSD (%)	M (min)	RSD (%)	M (%)	RSD (%)
1'	10,04	1,8	1,93	6,5	9,86	3,1	1,69	16,1
2'	9,80	1,9	5,33	10,6	9,59	2,8	5,21	8,3
3'	9,02	2,5	36,39	11,8	8,84	2,7	35,77	12,5
4'	8,87	2,5	24,44	6,3	8,70	2,6	25,05	6,8
5'	8,21	3,0	12,73	8,7	8,05	2,9	12,42	7,7
6'	7,41	3,3	10,94	8,2	7,21	2,7	11,34	11,5
7'	6,82	3,2	5,28	3,6	6,65	2,9	5,46	7,3
8'	6,42	3,3	1,71	3,7	6,25	2,6	1,76	13,0
9'	5,92	3,2	1,24	3,2	5,77	2,7	1,30	6,2

En el caso de los $\%A_{corr}$, los valores de RSD más elevados para el recubrimiento con UltraTrol, 3,2-11,8 intra-día y 6,2-16,1 inter-día, son debidos probablemente a la resolución entre picos obtenida para este recubrimiento, menor

en muchos casos en comparación con los recubrimientos de morfolina o bromuro de decametONIO. En estas condiciones, los valores de resolución obtenidos entre las diferentes isoformas de PSA se recogen en la Tabla 1.7.

Tabla 1.7. Valores de resolución obtenidos para las distintas isoformas de PSA resueltas por CZE, empleando UltraTrol LN como recubrimiento del capilar. Condiciones de análisis como en la Figura 1.16d.

Isoforma	1'	2'	3'	4'	5'	6'	7'	8'	9'
	R _{s1}	R _{s2}	R _{s3}	R _{s4}	R _{s5}	R _{s6}	R _{s7}	R _{s8}	
	0,53	1,40	0,34	1,10	1,00	0,87	0,71	0,99	

Las diferencias más notables, respecto a los recubrimientos dinámicos con morfolina y bromuro de decametONIO, se producen para las isoformas 1' y 2' y en mayor medida, para los picos 3' y 4' que aparecen como dos picos solapados (Figura 1.16d).

1.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

A lo largo del trabajo recogido en este capítulo, se ha estudiado el efecto de diferentes compuestos, añadidos o no al BGE, sobre la separación de isoformas de PSA por CZE con detección UV. Como resultado, se han obtenido tres métodos de CZE adecuados para el análisis de isoformas de PSA y su futuro estudio como potencial biomarcador del cáncer de próstata.

Los tres métodos desarrollados producen resultados con buena repetibilidad en términos de t_m y %A_{corr}, comparable a la que se describe en la bibliografía para otras glicoproteínas, e incluso en algunos casos mejor, y están basados en el uso de tres sustancias diferentes como recubrimientos del capilar, morfolina, bromuro de decametONIO y el producto polimérico comercial UltraTrol LN.

Las separaciones por CZE proporcionaron la resolución de 8 o 9 isoformas, dependiendo del recubrimiento empleado. La separación óptima con bromuro de decametONIO proporcionó el análisis por CZE con mejores valores de resolución para todas las isoformas de PSA y también el mayor tiempo de análisis, aunque las 8 isoformas detectadas se separaron en menos de 20 minutos. El análisis con morfOLINA en el BGE, aunque con una resolución inferior, proporcionó el tiempo de separación más corto, resolviendo 9 isoformas de PSA en menos de 8 minutos. Los análisis con UltraTrol LN empleado como recubrimiento del capilar, sin estar presente en el BGE, produjeron la menor resolución pero también en un tiempo de separación relativamente corto, menos de 9 minutos, y proporcionando el tiempo de análisis total más breve, debido a los tiempos ligeramente más cortos de acondicionamiento del capilar requeridos.

Se estudiaron otros aditivos poliméricos, MHEC y PEO, como recubrimientos dinámicos del capilar. Ninguno de los dos polímeros, añadidos al BGE o aplicados previamente, produjeron mejora en la separación de isoformas de PSA con respecto al método optimizado con morfOLINA en el BGE. Tampoco el recubrimiento comercial EOTrol LN proporcionó mejores resultados que el UltraTrol LN.

Los métodos de CZE se desarrollaron de forma que fueran compatibles con la derivatización fluorescente en-capilar de PSA a través de sus grupos amino, ya que ninguno de los aditivos empleados contiene estos grupos, a diferencia de los que se utilizan en algunos casos para la separación de isoformas de glicoproteínas por CZE. Por otro lado, el uso de SDS en el BGE a concentración submicelar, empleado por algunos autores en procesos de derivatización fluorescente, produjo el deterioro de la separación de isoformas de PSA cuando se encontraba a una concentración superior a 1 mM. Por tanto si es necesario su empleo, 1 mM es la máxima concentración de SDS que podrá contener el BGE para mantener una resolución adecuada.

La futura evaluación de la validez de los métodos de CZE obtenidos para la discriminación entre muestras de sanos y enfermos de cáncer de próstata, podría

realizarse bien con uno de los métodos, o bien combinándolos (analizando los datos procedentes de la aplicación de varios métodos sobre la misma muestra), porque si bien aparentemente las isoformas parecen corresponderse en los tres métodos, diferentes especies moleculares del PSA podrían estar migrando bajo cada una de ellas en cada uno de los tres métodos obtenidos.

1.5. REFERENCIAS

- [1] Peracaula, R., Tabares, G., Royle, L., Harvey, D. J., Dwek, R. A., Rudd, P. M., de Llorens, R., *Glycobiology* 2003, *13*, 457-470.
- [2] Lacunza, I., Lara-Quintanar, P., Moya, G., Sanz, J., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2004, *25*, 1569-1579.
- [3] Girard, M., Lacunza, I., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., en: Landers, J. P. (Ed.), *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, 3ª edición, CRC Press Inc., Boca Raton (Florida) 2008, pp. 631-706.
- [4] Lopez-Soto-Yarritu, P., Diez-Masa, J. C., Cifuentes, A., de Frutos, M., *J. Chromatogr. A* 2002, *968*, 221-228.
- [5] Lacunza, I., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2007, *28*, 1204-1213.
- [6] Ongay, S., Puerta, A., Diez-Masa, J. C., Bergquist, J., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2009, *30*, 1198-1205.
- [7] Rudd, P. M., Scragg, I. G., Coghill, E., Dwek, R. A., *Glycoconj. J.* 1992, *9*, 86-91.
- [8] Chang, W. W. P., Hobson, C., Bomberger, D. C., Schneider, L. V., *Electrophoresis* 2005, *26*, 2179-2186.
- [9] Lara-Quintanar, P., Lacunza, I., Sanz, J., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., *J. Chromatogr. A* 2006, *1153*, 227-234.
- [10] Lacunza, I., Sanz, J., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2006, *27*, 4205-4214.
- [11] Ongay, S., Puerta, A., Diez-Masa, J. C., Bergquist, J., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2009, *30*, 315-324.
- [12] Lucy, C. A., MacDonald, A. M., Gulcev, M. D., *J. Chromatogr. A* 2008, *1184*, 81-105.
- [13] Towns, J. K., Regnier, F. E., *Anal. Chem.* 1992, *64*, 2473-2478.
- [14] Horvath, J., Dolník, V., *Electrophoresis* 2001, *22*, 644-655.
- [15] Righetti, P. G., Gelfi, C., Verzola, B., Castelletti, L., *Electrophoresis* 2001, *22*, 603-611.

- [16] Oda, R. P., Madden, B. J., Spelsberg, T. C., Landers, J. P., *J. Chromatogr. A* 1994, **680**, 85-92.
- [17] Righetti, P. G., Gelfi, C., Sebastiano, R., Citterio, A., *J. Chromatogr. A* 2004, **1053**, 15-26.
- [18] Gelfi, C., Vigano, A., Ripamonti, M., Righetti, P. G., Sebastiano, R., Citterio, A., *Anal. Chem.* 2001, **73**, 3862-3868.
- [19] Taverna, M., Baillet, A., Biou, D., Schluter, M., Werner, R., Ferrier, D., *Electrophoresis* 1992, **13**, 359-366.
- [20] Landers, J. P., Oda, R. P., Madden, B. J., Spelsberg, T. C., *Anal. Biochem.* 1992, **205**, 115-124.
- [21] Donohue, M. J., Satterfield, M. B., Dalluge, J. J., Welch, M. J., Girard, J. E., Bunk, D. M., *Anal. Biochem.* 2004, **339**, 318-327.
- [22] Jankovic, M. M., Kosanovic, M. M., *Clin. Biochem.* 2005, **38**, 58-65.
- [23] Pelaez-Lorenzo, C., Diez-Masa, J. C., Vasallo, I., de Frutos, M., *Anal. Chim. Acta* 2009, **649**, 202-210.
- [24] Cifuentes, A., Santos, J. M., de Frutos, M., Diez-Masa, J. C., *J. Chromatogr. A* 1993, **652**, 161-170.
- [25] Cifuentes, A., de Frutos, M., Santos, J. M., Diez-Masa, J. C., *J. Chromatogr. A* 1993, **655**, 63-72.
- [26] Lopez-Soto-Yarritu, P., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., Cifuentes, A., *J. Sep. Sci.* 2002, **25**, 1112-1118.
- [27] Cifuentes, A., Moreno-Arribas, M. V., de Frutos, M., Diez-Masa, J. C., *J. Chromatogr. A* 1998, **830**, 453-463.
- [28] Mudrakovskii, I. L., Mastikhin, V. M., Kotsarenko, N. S., Shmachkova, V. P., *Kinet. Catal.* 1988, **29**, 165-169.
- [29] Grossman, P. D., en: Grossman, P. D., Colburn, J. C. (Ed.), *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*, Academic Press, Inc, San Diego (California) 1992, pp. 3-44.

- [30] Kinoshita, M., Murakami, E., Oda, Y., Funakubo, T., Kawakami, D., Kakehi, K., Kawasaki, N., Morimoto, K., Hayakawa, T., *J. Chromatogr. A* 2000, **866**, 261-271.
- [31] Palm, A., Zaragoza-Sundqvist, M., Marko-Varga, G., *J. Sep. Sci.* 2004, **27**, 124-128.
- [32] Puerta, A., Díez-Masa, J. C., Martín-Alvarez, P. J., Martín-Ventura, J. L., Barbas, C., Tuñón, J., Egido, J., de Frutos, M., *Analyst* 2011, **136**, 816-822.
- [33] Ongay, S., Neusuess, C., Vaas, S., Díez-Masa, J. C., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2010, **31**, 1796-1804.
- [34] Ongay, S., Martín-Alvarez, P. J., Neususs, C., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2010, **31**, 3314-3325.
- [35] Lasdun, A. M., Kurumbail, R. R., Leimgruber, N. K., Rathore, A. S., *J. Chromatogr. A* 2001, **917**, 147-158.
- [36] Iki, N., Yeung, E. S., *J. Chromatogr. A* 1996, **731**, 273-282.
- [37] Shen, Y. F., Smith, R. D., *J. Microcolumn Sep.* 2000, **12**, 135-141.
- [38] Garrido-Medina, R., Díez-Masa, J. C., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2011, **32**, 2036-2043.
- [39] Pinto, D. M., Arriaga, E. A., Craig, D., Angelova, J., Sharma, N., Ahmadzadeh, H., Dovichi, N. J., Boulet, C. A., *Anal. Chem.* 1997, **69**, 3015-3021.
- [40] Craig, D. B., Dovichi, N. J., *Anal. Chem.* 1998, **70**, 2493-2494.
- [41] Terabe, S., en: Landers, J. P. (Ed.), *Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques*, 3ª edición, CRC Press Inc., Boca Raton (Florida) 2008, pp. 109-134.
- [42] Balaguer, E., Neususs, C., *Anal. Chem.* 2006, **78**, 5384-5393.
- [43] Towns, J. K., Regnier, F. E., *J. Chromatogr.* 1990, **516**, 69-78.
- [44] Shou, C. Q., Zhou, C. L., Zhao, C. B., Zhang, Z. L., Li, G. B., Chen, L. R., *Talanta* 2004, **63**, 887-891.
- [45] Vayaboury, W., Kirby, D., Giani, O., Cottet, H., *Electrophoresis* 2005, **26**, 2187-2197.

Capítulo 2

*Cromatografía de inmunoafinidad para la purificación
de PSA a partir de muestras biológicas y análisis de sus
isoformas por electroforesis capilar*

ÍNDICE

2.1. INTRODUCCIÓN	161
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	164
2.2.1. Muestras y reactivos	164
2.2.2. Componentes del sistema cromatográfico	166
2.2.3. Preparación de la columna de IAC	167
2.2.4. Método de purificación por IAC	170
2.2.5. Método de CZE	171
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	171
2.3.1. Unión del Ab al relleno cromatográfico	171
2.3.2. Desarrollo del método de IAC	173
2.3.2.1. Optimización del agente de desorción	174
2.3.2.2. Evaluación del método de IAC optimizado	187
2.3.3. Aplicación a muestras de plasma seminal	190
2.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	197
2.5. REFERENCIAS	199

2.1. INTRODUCCIÓN

El análisis por CE de isoformas de PSA presente en muestras biológicas para su estudio como potencial biomarcador del cáncer de próstata, requiere una etapa previa de preparación de muestra para la extracción del PSA de las matrices que contienen dichas muestras. Para la extracción de una glicoproteína a partir de matrices biológicas se pueden emplear numerosas técnicas y métodos de purificación, algunos de los cuales ya se han mencionado en la Sección I.3 de la Introducción General de esta Memoria.

En los últimos años, el empleo de lectinas para este fin ha cobrado especial interés, debido a que estas proteínas, implicadas en procesos biológicos de reconocimiento, presentan una elevada especificidad frente a determinadas estructuras de glicano presentes en las glicoproteínas [1, 2]. El empleo de lectinas no se restringe a su aplicación de métodos de purificación de muestra sino que también se ha aplicado a estudios de proteómica y búsqueda de biomarcadores [3, 4]. En el caso concreto del PSA, la afinidad por lectinas se ha utilizado para el estudio de diferentes glicoformas del biomarcador de cáncer de próstata en orina, plasma seminal y suero [5-7]. Otro método empleado para el estudio y el enriquecimiento selectivo de la muestra en glicoproteínas ha sido el uso de ácido borónico, que también presenta una elevada afinidad por los azúcares presentes en estas proteínas [1, 8, 9].

Sin embargo, a la hora de purificar el PSA de un fluido biológico, la afinidad por lectinas o ácido borónico no parece un método muy apropiado ya que, en las muestras biológicas en las que tiene interés estudiar esta proteína, se encuentra una gran cantidad de otras glicoproteínas. Por ejemplo, en el caso de la sangre, de las casi 300 proteínas que se han detectado en plasma o suero, la gran mayoría se encuentran glicosiladas [10]. A pesar de que la mayoría de trabajos acerca del estudio de las formas moleculares del PSA como potencial biomarcador del cáncer de próstata se hayan realizado en suero [11], el análisis de estas formas moleculares por algunas

técnicas está limitado por la baja concentración en que se encuentra la glicoproteína en esta matriz (del orden subnanomolar). Este es el caso, por ejemplo, de la CE con detección UV, donde el LOD para proteínas se encuentra alrededor de μM . En este sentido, el plasma seminal representa una fuente de PSA aceptable, donde se encuentra como componente principal en forma de fPSA en una concentración aproximada de 0,5-3 mg/ml ($\approx 20\text{-}100\ \mu\text{M}$) [12]. El estudio de perfiles glicosídicos de PSA en plasma seminal procedente de individuos sanos, enfermos con BPH y pacientes con cáncer de próstata se ha realizado mediante HPLC y MS [13]. Recientemente, también se han propuesto como fuente abundante de PSA para su análisis como biomarcador de cáncer de próstata los fluidos de secreción expresada en la próstata (EPS), obtenidos tras la realización de un tacto rectal [14]. Tanto EPS como plasma seminal tienen la ventaja, además de su elevada concentración en PSA, de ser fluidos que, por su proximidad a la próstata, pueden reflejar mejor el estado de ésta que la sangre.

Por otro lado, como ocurre con todos los fluidos biológicos, el plasma seminal presenta un contenido elevado de proteínas, con una concentración media de 35 a 55 g/l y un número de especies diferentes superior a 900 [15]. Esta complejidad en las muestras de origen biológico hace necesario el empleo de un método de purificación muy selectivo. Además, el análisis posterior del PSA por CZE requiere una pureza muy elevada de la glicoproteína, pues pequeñas cantidades de interferentes podrían perjudicar la resolución de las isoformas o afectar a la repetibilidad del análisis, bien porque quedaran adsorbidos a la pared del capilar o porque migraran junto con las isoformas de la glicoproteína.

En la bibliografía se pueden encontrar varios procedimientos para la purificación de PSA a partir de muestras biológicas de diferente naturaleza como sangre, semen, tejido prostático o también cultivos de líneas celulares, en los que predominan los métodos cromatográficos. Por ejemplo, el PSA de plasma seminal ha sido purificado por IEC seguido de SEC [16] o por cromatografía de interacción

tiofílica [17]. Estos métodos son útiles para preparar grandes cantidades de PSA a partir de elevados volúmenes de fluidos, pero no son adecuados para nuestro objetivo, ya que son laboriosos y muy largos. Otros métodos más selectivos empleados para PSA son los de inmunoafinidad, que se han llevado a cabo empleando partículas magnéticas [18] y cromatografía de baja presión [19-23]. Estos métodos son lentos, con tiempos de elución de hasta 15 horas. En algunos casos, la purificación por inmunoafinidad se ha combinado con hasta cinco etapas cromatográficas, aumentando la duración del proceso de purificación [6].

En general, los métodos de purificación de PSA no basados en inmunoafinidad son procedimientos tediosos, excepcionalmente largos y en ocasiones producen una recuperación baja de la proteína, limitando la sensibilidad del análisis. Además, pueden presentar problemas de selectividad causados por la presencia de kalikreína 2, proteína que presenta una homología con el PSA de alrededor del 78% [23]. Por otro lado, los protocolos de elución empleados en los métodos de cromatografía de inmunoafinidad (IAC), pueden en ocasiones afectar la actividad de los enzimas, como es el caso del PSA, debido a modificaciones estructurales en la proteína que, a su vez, podrían afectar a la posterior separación por CE. Los métodos de IAC descritos en la bibliografía para la purificación de PSA, no contemplan el posible efecto del proceso de preparación de muestra sobre el perfil de isoformas de la glicoproteína. Por tanto, en la preparación de muestra, es importante optimizar el método de purificación de PSA a partir de una matriz biológica, para hacer posible el posterior análisis de esas isoformas por CE.

Como se ha discutido en la Introducción General de esta Tesis, la IAC en formato de HPLC parece ser una técnica muy adecuada para la purificación de PSA de muestras biológicas, ya que combina la elevada selectividad con que la proteína se une al Ab correspondiente con las prestaciones de la HPLC.

El objetivo del trabajo presentado en este Capítulo fue el desarrollo y optimización de un método de purificación de PSA por IAC que fuese rápido, simple,

de bajo coste y que proporcionase una pureza y recuperación de la glicoproteína suficientes para el adecuado análisis posterior de sus isoformas por CZE. El método se desarrolló empleando un Ab monoclonal anti-PSA disponible comercialmente, a diferencia de algunos métodos publicados hasta el momento en los que se emplean anticuerpos obtenidos en el propio laboratorio. Además, este método se desarrolló para el análisis de un volumen de plasma seminal del orden de unos pocos microlitros, cuando normalmente el volumen de muestra empleado para este fin es del orden del mililitro y se optimizó la elución del PSA de forma que no impidiese el análisis de sus isoformas por CZE, lo que hasta el momento no ha sido estudiado. Finalmente, el método de IAC optimizado se aplicó a diferentes muestras de plasma seminal.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Muestras y reactivos

Para la optimización del método de IAC se empleó el Patrón Europeo de PSA *BCR-613* purificado de plasma seminal humano, obtenido de *Resource Technology* (Salisbury, Reino Unido). El liofilizado de proteína se reconstituyó en agua para obtener una concentración aproximada de 1 mg/ml y se dividió en alícuotas que fueron guardadas a -20°C hasta su uso. Además del Patrón Europeo se utilizaron dos tipos de muestras naturales de plasma seminal, una procedente de un individuo sano y otra procedente de un paciente con cáncer de próstata. Ambas fueron obtenidas con el correspondiente consentimiento informado, aprobado por el Comité de Ética del Hospital Ramón y Cajal (Madrid). Las muestras fueron cedidas por los Doctores Eldiberto Fernández y Ricardo García, de este hospital. Por un lado, el fluido seminal del individuo sano se obtuvo por eyaculación. Por otro, el fluido seminal del paciente con cáncer de próstata, quien fue intervenido quirúrgicamente para la

extirpación de un tumor localizado en la glándula, fue extraído por punción de las vesículas seminales durante la intervención. El fluido seminal de ambas muestras naturales, tanto la de sano como la de enfermo, se clarificó por duplicado utilizando centrifugación durante 10 minutos a $1.200 \times g$ y 4°C . La muestra así obtenida se separó en alícuotas y se reservó a -20°C .

El Ab utilizado para la preparación de la inmunocolumna fue un Ab monoclonal anti-tPSA (ABIN 284705), purificado por afinidad a proteína A y que fue suministrado por *Antibodies On-line* (Aachen, Alemania). Según el proveedor, el Ab utilizado no presenta reactividad cruzada con la kalikreína 2. Los compuestos hidrogenofosfato sódico, dihidrógenofosfato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro magnésico, acetonitrilo y ácido clorhídrico fueron adquiridos a *Merck* (Darmstadt, Alemania). El ácido sulfúrico fue suministrado por *Panreac* (Barcelona). El glicerol fue vendido por *VWR* (Barcelona). La azida sódica se adquirió en *J.T. Baker* (Londres, Reino Unido). Por último, los reactivos periodato sódico, cianoborohidruro sódico, borohidruro sódico, glicina, ácido propiónico, urea, Tween®20, tris(hidroxietil) aminometano (Tris), Tris-HCl, tetraborato sódico, bromuro de decametonio y polioxietileno 23 lauril éter (Brij®35) fueron suministrados por *Sigma-Aldrich* (Steinheim, Alemania). Todas las disoluciones se prepararon con agua de calidad ultrapura, obtenida con un sistema de purificación Milli-Q® (*Millipore*, Bedford, MA, Estados Unidos).

La disolución madre de tampón fosfato salino (PBS) fue preparada en una concentración 10x. A partir de ella se preparó por dilución con agua la disolución de trabajo de PBS, consistente en dihidrogenofosfato/hidrogenofosfato sódicos 0,01 M, cloruro sódico 0,138 M y cloruro potásico 2,7 mM a pH 7,4.

Todas las disoluciones empleadas, a excepción de las muestras, se filtraron mediante filtros de jeringa con membrana de nylon con un tamaño de poro de $0,2 \mu\text{m}$, suministrados por *Teknokroma* (Barcelona).

2.2.2. Componentes del sistema cromatográfico

El sistema de cromatografía consistió en un equipo montado en el laboratorio, cuyo esquema se puede observar en la Figura 2.1. En primer lugar se encuentra una bomba HPLC modelo 510 de *Waters* (Milford, MA, Estados Unidos). A continuación se pueden ver las dos válvulas de seis vías, modelo 7125 de *Rheodyne* (Cotati, CA, Estados Unidos) conectadas en serie para la inyección de eluyente y muestra. Conectada también en serie con las válvulas, se puede observar la columna de IAC. La columna consistió en un tubo de acero de 3 cm de longitud, con un recubrimiento interno de poliéter éter cetona (PEEK), para evitar interacciones inespecíficas con las proteínas, y un diámetro interno de 2,1 mm (*Grace Davison Discovery Science*, Deerfield, IL, Estados Unidos). La columna se suministró con dos fritados de 2 μ m de tamaño de poro, que se colocaron en ambos extremos de la columna y dos reducciones de 1/4" a 1/16", mediante las cuales se conectó al resto del sistema cromatográfico. El último componente del sistema de HPLC que puede observarse es el detector de UV-Vis modelo LC-95 de *Perkin Elmer* (Norwalk, CO, Estados Unidos) conectado al sistema de adquisición de datos, donde se monitorizó a 280 nm el proceso de captura y elución del PSA.

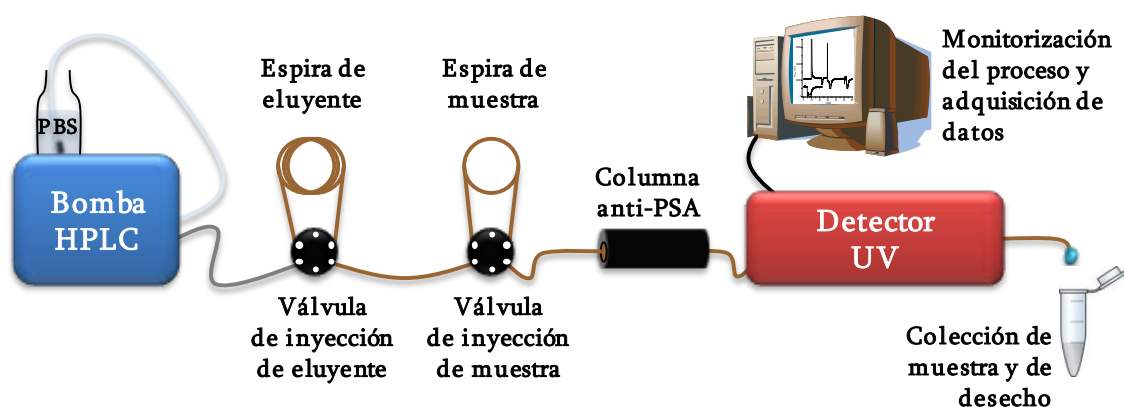


Figura 2.1. Esquema del sistema cromatográfico usado para la puesta a punto del método de purificación de PSA por IAC.

Conectada a la primera válvula se puede ver la espira de inyección de eluyente o agente de desorción, fabricada con un tubo de PEEK de 0,76 mm de diámetro interno con un volumen de 1,4 ml. Del mismo modo, se conectó otra espira fabricada con el mismo tipo de tubo a la segunda válvula para la inyección de muestra, en este caso con un volumen de 100 µl. Para conectar las dos válvulas entre sí y la columna a la segunda válvula y al detector, se empleó tubo de PEEK también de 0,76 mm de diámetro interno. A la salida del detector, para la recogida de fracciones, se instaló otro tubo del mismo material pero en este caso con un diámetro interno de 0,13 mm.

2.2.3. Preparación de la columna de IAC

Para la preparación del relleno cromatográfico se empleó *Protein-Pack* de *Waters* (Milford, MA, Estados Unidos), basado en partículas de sílice funcionalizada con grupos epóxido, con un diámetro de partícula nominal de 40 µm y un tamaño de poro nominal de 500 Å. A este relleno se unió el Ab anti-tPSA mediante un protocolo basado en los previamente usados en el laboratorio para otras proteínas [24-27] y que se describe brevemente a continuación.

Para la unión del Ab se partió de 75 mg del material de relleno. El procedimiento seguido para la unión del Ab anti-tPSA a este material se puede ver esquematizado en la Figura 2.2. En primer lugar, se realizó la hidrólisis ácida de los grupos epóxido para obtener el correspondiente diol. Para ello, se añadieron 3,6 ml de ácido sulfúrico 0,072 N y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora, tiempo después del cual se eliminó el sobrenadante y se lavó el material repetidas veces con agua. A continuación, la oxidación con periodato produjo el aldehído, para lo que se añadió 1 ml de periodato sódico 0,23 M y se mantuvo en agitación durante 2 horas, también a temperatura ambiente. La reacción con periodato se detuvo por adición de 0,7 ml de glicerol en 3 ml de tampón de acoplamiento, que consistió en una disolución de dihidrogenofosfato/

hidrogenofosfato 0,1 M a pH 5,7, manteniendo la suspensión en agitación durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se desechó el sobrenadante y se lavó el relleno con diferentes porciones del tampón de acoplamiento.

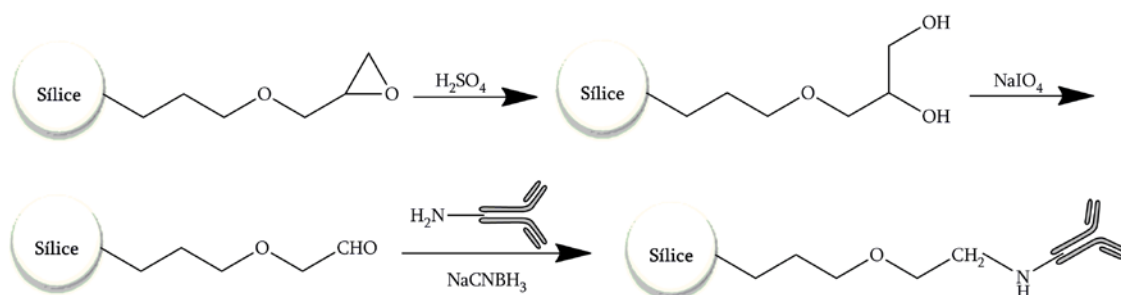


Figura 2.2. Pasos de reacción seguidos para el acoplamiento del Ab anti-tPSA a las partículas de sílice funcionalizadas con grupos epóxido.

El siguiente paso fue la unión del Ab, a través de las aminas primarias, al relleno para lo cual se partió de 1 mg del Ab, suministrado en PBS a pH 7,4 con azida sódica al 0,1%. En un primer paso, la amina primaria formó la imina correspondiente por enlace con el carbono del aldehído (base de Schiff). En segundo lugar, en presencia de un reductor suave como es el cianoborohidruro, la base de Schiff se transformó en la amina secundaria, que puede observarse en el último paso de la reacción (Figura 2.2), adquiriendo mayor estabilidad [28]. En la práctica, para realizar la unión del Ab, se eliminó en primer lugar el tampón de conservación del Ab por centrifugación en un dispositivo de ultrafiltración con una membrana de tamaño de poro nominal de 50 kDa, Microcon[®] YM-50 suministrado por *Millipore* (Billerica, MA, Estados Unidos). Para la utilización del Microcon en la limpieza y recuperación del Ab, el dispositivo se trató previamente con una disolución de Brij[®]35 al 5% durante 12 horas a temperatura ambiente, a fin de pasivarlo y evitar la pérdida parcial de Ab por adsorción [29]. Empleando este dispositivo pasivado, el Ab se recuperó en un volumen de 0,4 ml de tampón de acoplamiento y se añadió al relleno junto con 0,4 ml de cianoborohidruro sódico 0,1 M, también en tampón de acoplamiento. La suspensión se mantuvo en agitación durante 65 horas a 4°C.

Finalmente, los grupos aldehído que quedaron sin reaccionar se bloquearon mediante reacción de reducción con un exceso de borohidruro sódico, para evitar posibles interacciones no específicas cuando se inyectase la muestra. Para ello, transcurrido el tiempo de reacción de acoplamiento, se añadieron a la suspensión 1,5 mg de borohidruro sódico y se mantuvo en agitación 1 hora más, también a 4°C. Finalmente, se recuperó el sobrenadante y se lavó el relleno con una solución de dihidrogenofosfato/hidrogenofosfato 0,1 M a pH 7, seguido de la misma disolución con cloruro sódico 0,5 M y, por último, con azida sódica al 0,1% en PBS. En esta disolución se conservó el relleno en suspensión hasta su empaquetamiento en la columna. El rendimiento de acoplamiento del Ab al relleno cromatográfico se estimó por la medida de la absorbancia a 280 nm del Ab anti-tPSA en tampón de acoplamiento, antes de la reacción y en el sobrenadante posterior, para lo cual se utilizó un espectrofotómetro modelo DU® 800 de Beckman Instruments (Fullerton, CA, Estados Unidos).

Para el empaquetamiento de la columna se empleó un dispositivo fabricado en el laboratorio que consistía en la unión a ésta última de una precolumna, con el mismo diámetro interno, de 0,5 ml de volumen y un depósito cilíndrico de 13,5 ml de volumen. En el extremo inferior de la columna, para mantener el relleno en su interior se colocó un fritado. A continuación, se añadió un volumen de PBS suficiente para rellenar columna y precolumna, se añadió el relleno en suspensión al dispositivo, se completó el volumen con PBS y se conectó el extremo superior del depósito a la bomba de HPLC. Un flujo constante de PBS a 9,9 ml/min durante 15 minutos permitió el empaquetamiento del relleno en la columna de IAC. Transcurrido este tiempo, se paró el flujo y se dejó el dispositivo en reposo durante 15 minutos, antes de desconectar la columna del dispositivo de empaquetamiento. Finalmente, se colocó el fritado en la parte superior de la columna y ésta se lavó con azida sódica al 0,1% en PBS para conservarla a 4°C hasta su utilización.

2.2.4. Método de purificación por IAC

EL flujo de PBS para el desarrollo y optimización del método IAC se mantuvo a 0,5 ml/min, salvo que se indique lo contrario. Al principio y final de cada día de uso, se hizo pasar PBS por la columna durante al menos 20 minutos para su limpieza y equilibrado. Antes de inyectar PSA patrón o muestra, la columna se limpió adicionalmente mediante la inyección de fracciones de 0,6 ml de eluyente, hasta que no se observó cambio en la señal del detector que indicara elución de sustancias retenidas en la columna procedentes de inyecciones anteriores.

La optimización del método se realizó con PSA patrón que se inyectó en la columna en alícuotas de 20 µl de 0,5 mg/ml en PBS. A continuación, se recogió la fracción no retenida. Para eluir la glicoproteína retenida en la columna, se inyectaron 0,5 ml del agente de desorción (ver más abajo), recogiendo inmediatamente la fracción de PSA eluída. Para la inyección de muestras de plasma seminal, éstas se diluyeron en relación 1:10 o 1:20 en PBS y se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas (P2714, *Sigma-Aldrich*) en un 1% (v/v) para evitar la degradación de la muestra y del Ab durante el proceso cromatográfico.

Las fracciones de PSA eluídas se recogieron sobre disoluciones de neutralización, Tris 1 M en el caso de eluyentes ácidos o Tris-HCl 1 M en el caso de eluyentes alcalinos. Las fracciones neutralizadas se llevaron a dispositivos Microcon YM-10, con una membrana de tamaño de corte nominal de 10 kDa, previamente tratados con Brij®35 y se eliminaron así las sales por ultrafiltración a 4°C, recuperando el PSA purificado en un volumen de agua de 4-10 µl. Las fracciones no retenidas en la columna de IAC, también se recogieron y, sin neutralizar, se sometieron al mismo proceso de limpieza y concentración en dispositivos Microcon YM-10.

2.2.5. Método de CZE

Tanto las fracciones no retenidas en la columna de inmunoafinidad como las eluídas de ésta, tras ser lavadas y concentradas empleando dispositivos Microcon, se analizaron por CZE en el mismo aparato de CE descrito en el Capítulo 1, un modelo G1600AX de *Agilent Technologies* (Waghäusel, Alemania), equipado con un detector UV-Vis de fila de diodos. El control de los parámetros en las separaciones y el registro de los datos se realizó mediante el software instrumental *3D-CE Chemstation* (*Agilent Technologies*).

El método de CZE empleado fue el que proporcionó mayor resolución entre los desarrollados, como se ha descrito en el Capítulo 1. Por tanto, los capilares empleados en las separaciones fueron de 78,5 y 70 cm de longitudes total y efectiva, respectivamente, con un diámetro interno de 50 μm , y fueron adquiridos a *Polymicro Technologies* (Phoenix, AZ, Estados Unidos). El acondicionamiento de los capilares, nuevos y entre inyecciones, se realizó como se ha indicado en el Capítulo 1 (apartado 1.2.3). El BGE utilizado en todas las separaciones consistió en tetraborato sódico 5 mM, dihidrogenofosfato sódico 10 mM y bromuro de decametonio 2 mM a pH 9,0. Las separaciones se llevaron a cabo a 25 kV y 35°C. La inyección de muestra fue del tipo hidrodinámica (35 mbar durante 30 segundos) y la detección UV se realizó a 214 nm.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Unión del Ab al relleno cromatográfico

El empleo de partículas de sílice como material de empaquetamiento para la preparación del relleno cromatográfico en IAC, proporciona una notable ventaja frente a otros materiales, como celulosa o agarosa, en términos de rapidez, reproducibilidad y eficacia. Esto es debido fundamentalmente a la estabilidad

mecánica de la sílice, que permite el empleo de altas presiones y a la posibilidad de emplear tamaños de partícula pequeños, lo que se traduce en distancias de difusión pequeñas para los analitos [28]. Por otro lado, la unión covalente del ligando, en este caso el Ab, corresponde con el procedimiento más comúnmente empleado en IAC, existiendo varios tipos de química de unión disponibles [30]. Concretamente, la reacción a través de los grupos amino del Ab con grupos aldehído es un método con buen rendimiento de unión, que comenzó a utilizarse hace varias décadas [31] y del cual existe experiencia en el laboratorio en el que se ha realizado el presente trabajo [24-27].

Como se ha indicado en el apartado 2.2.3, el rendimiento de unión del Ab anti-tPSA se estimó mediante espectrofotometría UV a 280 nm, midiendo la solución de Ab antes y después del acoplamiento. En la Figura 2.3 se pueden observar ambos espectros de absorbancia.

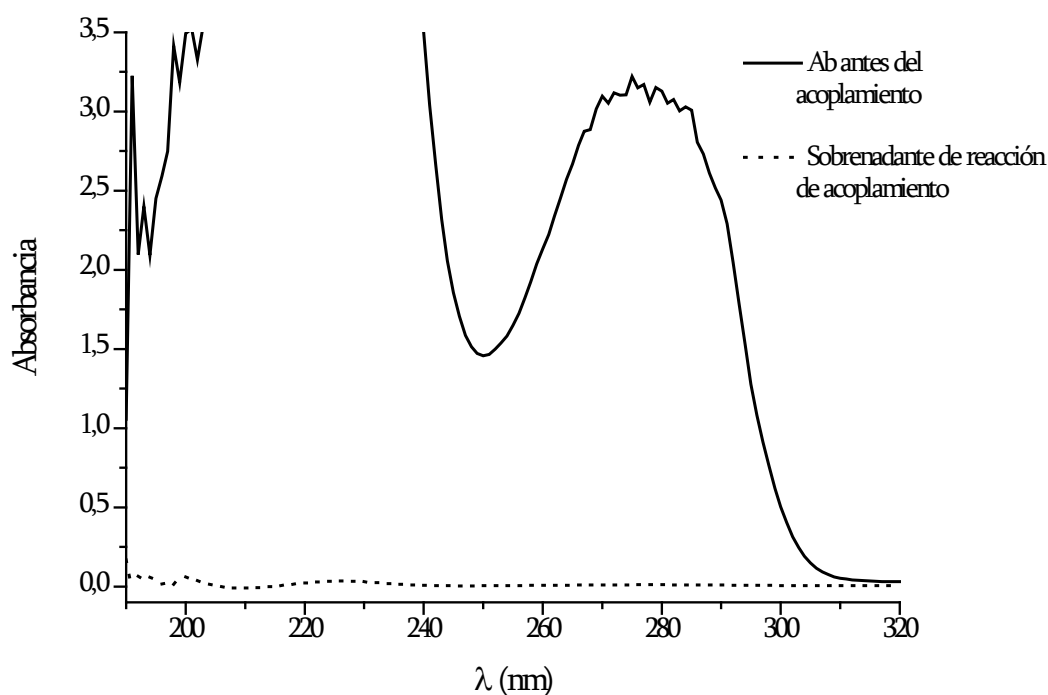


Figura 2.3. Espectros de absorción UV del Ab anti-PSA en tampón de acoplamiento, antes y después de la unión a las partículas de sílice.

El procedimiento de acoplamiento del Ab anti-tPSA realizado por duplicado con dos lotes diferentes del Ab para la preparación de dos columnas diferentes, produjo en ambos casos un rendimiento estimado de unión superior al 95%. El rendimiento de la reacción de unión en cada una de las columnas, expresado en miligramos de anti-tPSA unido por gramo de relleno cromatográfico, correspondió a 12,7 y 13,3 mg/g. El tubo de la columna utilizada presenta un volumen nominal de 103 μ l y el relleno de sílice empleado una densidad de empaquetamiento aproximada de 0,5 g/ml, lo que proporcionó una cantidad aproximada de relleno en la columna de 52 mg y una masa de anti-tPSA estimada de 0,66 y 0,69 mg, para cada una de las columnas.

2.3.2. Desarrollo del método de IAC

Para el desarrollo del método de IAC se empleó PBS a pH 7,4 como tampón de unión o captura del PSA en la inmunocolumna. Este tampón se usa frecuentemente para esta aplicación ya que la interacción Ag-Ab se suele ver favorecida en condiciones fisiológicas, en las que la unión al Ab se produce con unas constantes de equilibrio muy elevadas, entre 10^6 y 10^{12} M^{-1} [30]. Utilizando este tampón de unión, se optimizó el agente empleado para eluir el PSA capturado por el Ab (agente de elución o desorción). Como criterios de optimización se consideraron los valores de: recuperación, eficacia de purificación y repetibilidad obtenidos a partir del perfil de CZE del PSA eluído respecto a PSA sin someter a IAC. En este sentido, los métodos de SPE que se utilizan para la purificación de proteínas, como se puede considerar la IAC, ocasionan a menudo la pérdida de actividad fisiológica de la proteína extraída [32]. Esta pérdida de actividad puede estar causada por la naturaleza desnaturalizante para proteínas que presentan algunas sustancias empleadas como agentes de desorción en IAC. En efecto, algunas de estas sustancias se emplean para este fin, ya que el cambio en la estructura de las proteínas facilita la disociación de la unión Ag-Ab, en algunos casos de una excepcional estabilidad. En

el caso de la elución del PSA, los agentes de desorción comúnmente empleados podrían en este sentido alterar el perfil electroforético de isoformas de la glicoproteína, y producir resultados irreproducibles, lo que invalidaría el método de preparación de muestra para futuros estudios en los que se compare el perfil electroforético de PSA entre individuos sanos y enfermos. Por ello, se ha prestado especial atención a este criterio de optimización en la selección del agente de elución.

2.3.2.1. Optimización del agente de desorción

Como se ha mencionado en la Introducción General, las sustancias más utilizadas como agentes de desorción en IAC son disoluciones que producen un cambio de pH, agentes caotrópicos, con una fuerza iónica elevada, y modificadores orgánicos, los cuales pueden favorecer la desnaturalización de la estructura terciaria de las proteínas, provocando de esta manera la disociación entre Ab y Ag [30]. Los eluyentes utilizados para la desorción del PSA en el presente estudio se encuentran recogidos en la Tabla 2.1. En ella, Gly-HCl, pH 2,7 corresponde a glicina 0,1 M ajustado a pH 2,7 con HCl, mientras que ACN 40% corresponde a acetonitrilo al 40% (v/v) en agua. Los valores de porcentaje de recuperación (R) obtenidos con cada uno de los eluyentes empleados, se presentan en la misma Tabla. Estos valores se obtuvieron a partir de la suma de las áreas de todas las isoformas del PSA eluido separadas por CZE, dividida por la suma de las áreas obtenida para las isoformas de un patrón de PSA 1 mg/ml analizado el mismo día por el mismo método de CZE. Para el cálculo de R (%) se tuvo en cuenta el volumen (4-10 microlitros) en que se recuperaba la proteína empleando los dispositivos de ultrafiltración en centrífuga.

Tras la inyección de 10 µg del patrón de PSA en el sistema de IAC, la fracción de glicoproteína no retenida en la columna se recogió, se limpió y concentró en Microcon y se analizó por CZE. Se comprobó que entre un 2,5 y un 5% del PSA no se capturaba en la columna, manteniéndose este porcentaje de pérdida a lo largo de

análisis sucesivos de patrones. Posteriormente, se inyectó una cantidad menor de PSA (5 µg), originando la misma proporción de PSA no retenido en la columna, indicando que no existía saturación de los sitios de unión en el Ab acoplado al relleno cromatográfico. Estos resultados indicaban que la existencia de una pequeña fracción de PSA que no era retenido en la columna, no se debía a que se sobrepasara su capacidad de carga.

Tabla 2.1. Valores de porcentaje de recuperación, R, obtenidos con los distintos agentes de desorción ensayados en el método de IAC para la purificación de PSA.

Agente de desorción	R (%)
Gly-HCl, pH 2,7	49
MgCl ₂ 2 M, pH 4,5	n.d.
MgCl ₂ 4 M, pH 6,0	n.d.
NaCl 1 M	n.d.
ACN 40%	44
Gly 0,4 M, pH 9,0	6
Gly 0,4 M/urea 6 M, pH 9,0	29
Gly 0,4 M/Tween [®] 20 0,01%, pH 9,0	18
Gly 0,4 M/urea 6 M/Tween [®] 20 0,01%, pH 9,0	74
Ácido propiónico 1 M	42

n.d.: PSA no detectado en análisis por CZE

El primer agente de desorción ensayado correspondió a Gly-HCl, una solución que había sido ya empleada en la purificación por inmunoafinidad del PSA [20-22, 33, 34], y con la cual también existía experiencia previa en el laboratorio para otras proteínas [27, 29]. El cromatograma obtenido con este eluyente a pH 2,7 se puede observar en la Figura 2.4, con la inyección del patrón de PSA y un blanco de PBS. En primer lugar se puede ver un pequeño pico correspondiente a PSA que no

ha sido retenido en la columna. A continuación, una vez se ha recuperado la línea de base indicando que toda la muestra no retenida ha salido del sistema cromatográfico, se realizó la inyección de Gly-HCl con la consecuente elución del PSA que había sido retenido por la columna. Tras la elución del PSA retenido, inyecciones sucesivas de Gly-HCl no produjeron elución adicional de PSA, ya que se obtiene una señal cromatográfica similar a la observada en el blanco al inyectar agente de elución.

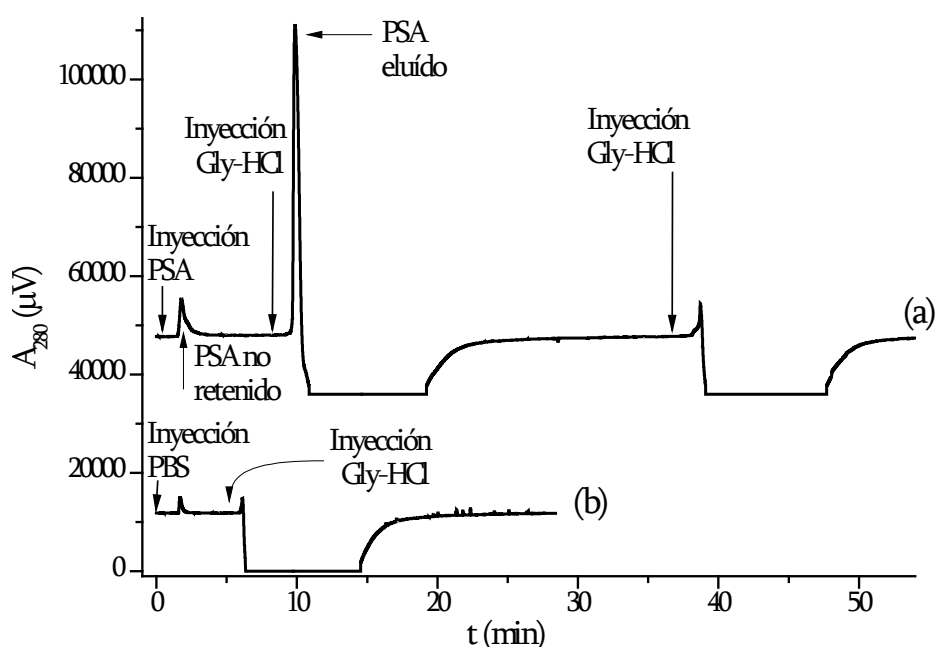


Figura 2.4. Cromatograma de inmunoafinidad para (a) PSA patrón y (b) un blanco realizado con PBS. Elución con Gly-HCl, pH 2,7. Condiciones: flujo 0,5 ml/min, monitorización a 280 nm.

La elución con este agente condujo a una recuperación del 49% de PSA. Sin embargo, aunque el porcentaje de recuperación era aceptable, los análisis por CZE del PSA eluido en estas condiciones revelaron un cambio en el perfil electroforético de la glicoproteína cuando se comparó con el del patrón sin someter a IAC, siendo más evidente este cambio en las isoformas de menor t_m , como se puede observar en la Figura 2.5. Además, análisis sucesivos por CZE de la misma alícuota de PSA (conservada a 4°C entre análisis) eluido con Gly-HCl manifestaron un cambio progresivo en el perfil de isoformas (Figura 2.5 b1, b2 y b3). Este hecho podría

atribuirse a que el PSA sufra un proceso de desnaturalización en contacto con este eluyente, produciendo un cambio en la estructura tridimensional de la proteína y alterando las propiedades electroforéticas, que además podría ser reversible dada la tendencia que sigue el perfil de isoformas, más similar cada vez al perfil de PSA sin someter a IAC (Figura 2.5a), a medida que transcurre el tiempo desde la eliminación del eluyente.

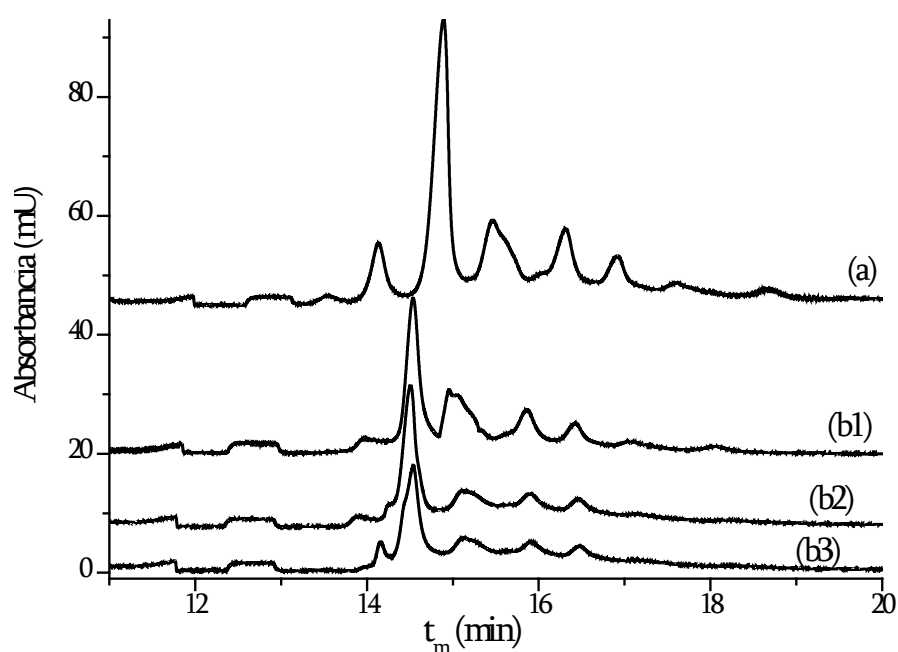


Figura 2.5. Análisis por CZE de (a) PSA patrón 1 mg/ml sin someter a IAC y (b1), (b2) y (b3) inyecciones consecutivas (ver texto) del PSA eluído de la columna IAC con Gly-HCl según Figura 2.4. BGE: tetraborato sódico 5 mM, dihidrogenofosfato sódico 10 mM y bromuro de decametonio 2 mM a pH 9,0. Condiciones de separación: L = 78,5 cm, l = 70 cm, 35°C y 25 kV. Inyección hidrodinámica a 35 mbar durante 30 s. Detección a 214 nm.

Teniendo en cuenta esta evolución temporal en el perfil obtenido por CZE que manifiesta el PSA eluído con Gly-HCl de la inmunocolumna, se procedió a continuación a estudiar la posibilidad de renaturalizar la glicoproteína con el fin de obtener un perfil de isoformas reproducible. La renaturalización de proteínas es un proceso complejo que varía de unas proteínas a otras. Un método muy generalizado para este fin es la dilución de la proteína, que aumenta la dificultad de estas

moléculas para formar agregados a concentraciones menores de 10 µg/ml [35]. Para realizar este estudio, una alícuota de PSA patrón fue mezclada con Gly-HCl pH 2,7 e inmediatamente neutralizada con una disolución de Tris 1 M, diluida con PBS hasta una concentración inferior a 10 µg/ml y limpiada en un dispositivo Microcon también con porciones de PBS, puesto que las sales como el cloruro sódico también pueden favorecer el proceso de renaturalización [35]. Una vez cambiado posteriormente el PBS por agua, el análisis de esta alícuota por CZE demostró que el PSA no alcanzó la renaturalización por dilución en PBS ya que el perfil de isoformas, aunque era más parecido al original que el de la muestra sin tratar con PBS, era todavía diferente al de PSA no sometido a IAC. En conclusión, el eluyente Gly-HCl no parece adecuado para la purificación de PSA por IAC para su posterior análisis por CZE, puesto que las separaciones electroforéticas producen perfiles irreproducibles y diferentes al perfil de PSA patrón sin tratar. Otros autores han empleado para la elución de PSA glicina a pH en el intervalo 2,5 a 3,0, sola o en combinación con cloruro sódico, con porcentajes de recuperación de PSA entre el 15 y el 60% [20, 21], pero en ningún caso se ha encontrado información sobre su efecto en la estructura de la glicoproteína.

Las disoluciones de cloruro magnésico y cloruro sódico con una elevada fuerza iónica, también han sido previamente empleadas para la elución de PSA en métodos de purificación basados en IAC, con buenos rendimientos de recuperación y pureza [21]. En la Figura 2.6 se puede observar el cromatograma de inmunoafinidad obtenido para uno de estos agentes caotrópicos y que es representativo de los obtenidos con los tres agentes (cloruro magnésico 2 M y 4 M y cloruro sódico 1 M). Como se puede observar, el blanco de elución sin inyección de PSA (Figura 2.6b) genera una señal prácticamente idéntica a la que se produce en la etapa de elución de PSA (Figura 2.6a) en el cromatograma de inmunoafinidad, indicando presumiblemente que la glicoproteína no se está desorbiendo de la columna con este agente. Adicionalmente, el pico observado tras una inyección posterior de Gly-HCl

(Figura 2.6a) parece indicar que había PSA retenido en la columna, que se eluye con este agente de desorción. Como confirmación a lo observado en el cromatograma de inmunoafinidad, se comprobó mediante el análisis por CZE-UV que el empleo como eluyentes de los agentes caotrópicos con concentraciones de ion cloruro de 1, 4 u 8 M, no proporcionaron PSA en la fracción de elución en concentración detectable (Tabla 2.1).

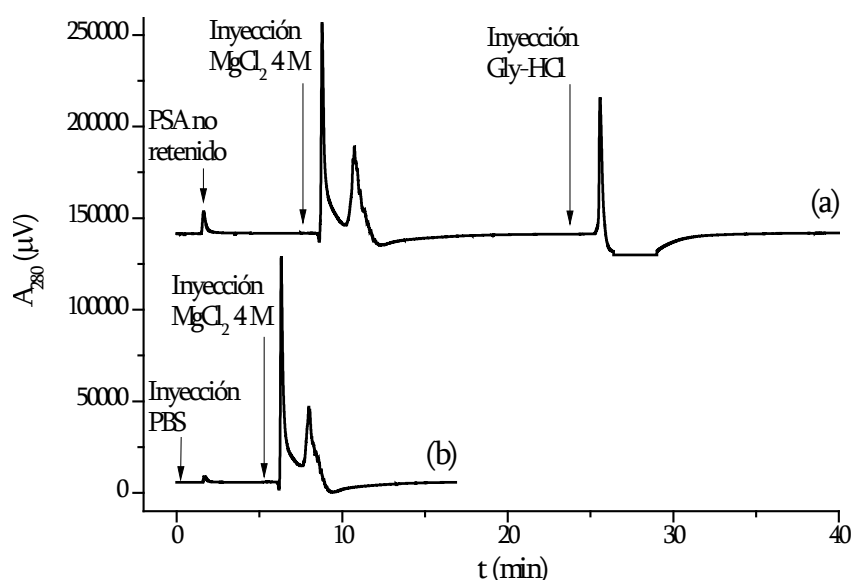


Figura 2.6. Cromatograma de inmunoafinidad para (a) PSA patrón y (b) un blanco. Elución con MgCl_2 4 M. Condiciones: flujo 0,5 ml/min, monitorización a 280 nm.

A continuación, se investigó la viabilidad del uso de un modificador orgánico como agente de desorción de PSA en el proceso de IAC. El uso de este tipo de aditivos requiere un especial cuidado, ya que podrían desnaturalizar irreversiblemente la estructura del Ab en la columna, disminuyendo la capacidad de ésta y acortando su vida útil. En este sentido, disolventes como metanol y etanol han sido descritos como modificadores que afectan gravemente a la capacidad de regeneración de la columna de inmunoafinidad [30]. Por esta razón, se escogió el acetonitrilo para su empleo como eluyente en la etapa de desorción de PSA. Se escogió como concentración inicial un 40% de acetonitrilo en agua, que se había

empleado con éxito y larga durabilidad de las columnas en otro proceso de IAC realizado en nuestro grupo [36].

La elución con acetonitrilo produjo una recuperación de PSA patrón del 44%. En las purificaciones posteriores de alícuotas de patrón de PSA no se observó incremento en la proporción de la glicoproteína no retenida, por lo que parece que el acetonitrilo no producía desnaturalización irreversible del Ab en la columna.

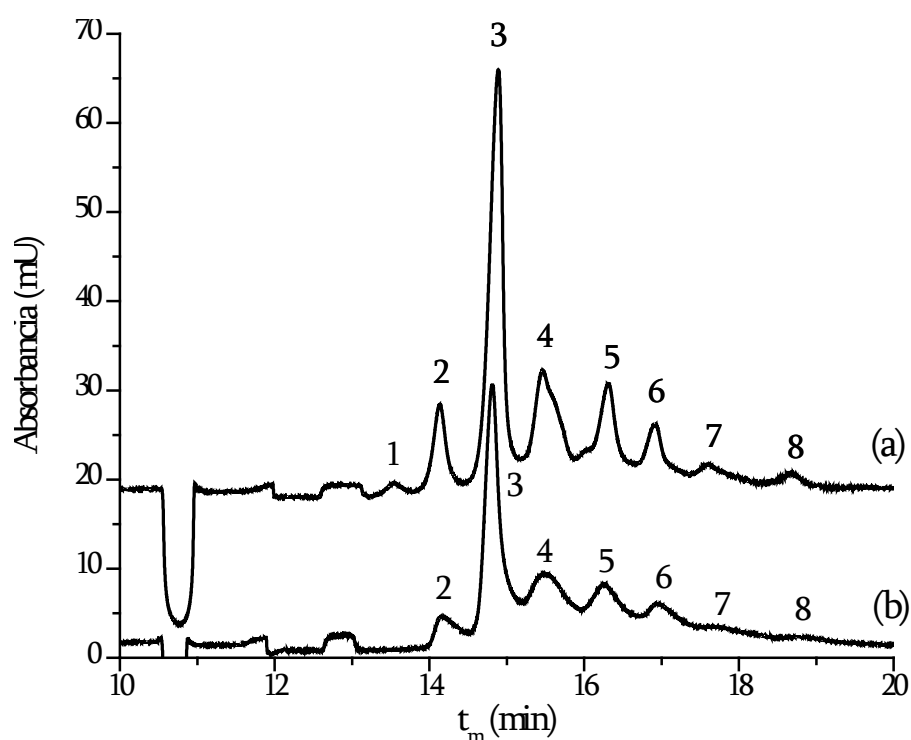


Figura 2.7. Análisis por CZE de (a) PSA patrón 1 mg/ml sin tratamiento por IAC y (b) PSA eluído de la columna IAC con ACN al 40%. Condiciones electroforéticas como en la Figura 2.5.

Por otro lado, aunque el análisis por CZE de las alícuotas de PSA eluído producía separaciones reproducibles, la resolución de las isoformas era marcadamente inferior que para el PSA sin tratamiento de purificación, dejando incluso de observarse la isoforma de menor tiempo de migración (Figura 2.7). Este hecho podría ser debido a una desnaturalización parcial e irreversible del PSA cuando entra en contacto con el modificador orgánico a esa concentración, no

recuperándose la estructura inicial tras la eliminación del acetonitrilo en el dispositivo Microcon.

Así pues, se decidió estudiar otros eluyentes con el fin de comprobar si podían mejorarse los resultados obtenidos con acetonitrilo. A este respecto, otros autores han empleado un agente de desorción consistente en tampón Tris a pH 11,6 para la purificación de PSA por IAC con elevada recuperación (66-91%) [21, 23]. No obstante, el eluyente que emplearon esos autores, con un pH excesivamente básico, planteaba un problema en su utilización con el relleno cromatográfico de base sílice utilizado en el presente trabajo, ya que este material es inestable a pH superior a 9,5 pudiendo sufrir hidrólisis. Por ello, en el presente estudio se han empleado agentes de elución alcalinos con menor pH.

Los eluyentes que se utilizaron a pH básico fueron tamponados con glicina a pH 9,0 y se combinaron con la presencia de dos aditivos, urea en concentración 6 M y/o Tween®20 al 0,01% (w/v). Se sabe que estos dos aditivos tienen actividad desnaturalizante, con lo que podrían romper la unión Ag-Ab [37], pero no está descrito si la eliminación posterior de los aditivos permite la renaturalización del PSA o el Ab. Se comprobó que solamente con la presencia simultánea de ambos agentes en el tampón de desorción se producía una recuperación aceptable, correspondiente a un 74%. Esta recuperación es superior a la obtenida con Gly-HCl o con acetonitrilo (Tabla 2.1). En ausencia del tensioactivo, es decir únicamente con la urea, la recuperación fue muy baja (29%). En el caso contrario, en presencia únicamente del tensioactivo la recuperación disminuye aún más, hasta un 18%. Finalmente, en ausencia de ambos aditivos la capacidad de desorción es prácticamente nula, con una recuperación de tan solo el 6%. Estos datos demuestran que para obtener una recuperación elevada es necesaria la presencia de ambos aditivos en la solución de desorción a pH 9,0.

Los análisis por CZE de las alícuotas del PSA eluido con urea y/o Tween®20 se muestran en la Figura 2.8, en la que se puede observar que el perfil para el PSA

eluído con cualquiera de las soluciones de desorción es muy diferente al obtenido para el PSA sin pasar por la columna de IAC.

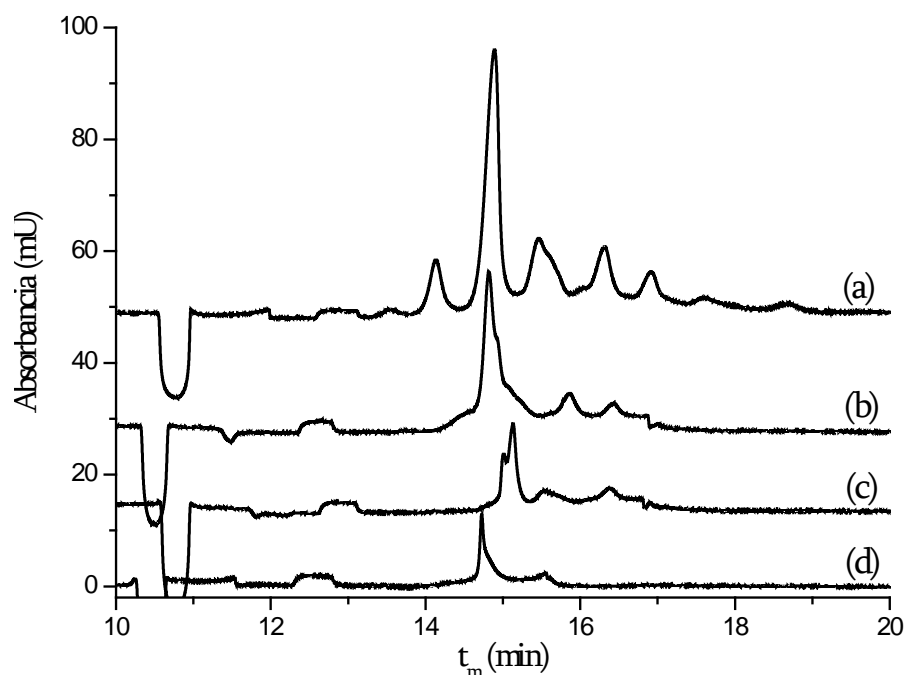


Figura 2.8. Análisis por CZE de (a) PSA patrón 1 mg/ml sin pasar por la columna de IAC, (b) PSA eluído con glicina 0,4 M, urea 6 M y Tween®20 al 0,01% a pH 9,0, (c) PSA eluído con glicina 0,4 M y urea 6 M a pH 9 y (d) PSA eluído con glicina 0,4 M y Tween®20 al 0,01% a pH 9. Condiciones electroforéticas como en la Figura 2.5.

El efecto desnaturizante de la urea parece ser evidente si observamos las Figuras 2.8b y 2.8c, en las que, comparadas con el patrón intacto, se pierde mucha resolución y además la proporción de isoformas resulta diferente, llegando incluso a perder algunas de ellas. El efecto del Tween®20 en solitario, mostrado en la Figura 2.8d podría tener una naturaleza distinta, ya que únicamente pueden distinguirse 2 picos correspondientes probablemente a las isoformas mayoritarias, en concordancia con el bajo porcentaje de recuperación proporcionado por este eluyente, sin que pueda descartarse que el efecto del tensioactivo en la separación por CZE podría ser causado por una elución selectiva de isoformas de la columna de IAC. Por otro lado, la desnaturización con urea parece tener efectos reversibles, al menos parcialmente, como demostró el análisis por CZE a lo largo del tiempo de la alícuota

de PSA eluída con el agente de desorción que contenía únicamente este aditivo (Figura 2.9). La evolución del perfil electroforético parece indicar que el PSA tiende a recuperar su estructura original con el tiempo transcurrido, conservándose a 4°C entre análisis, desde que se elimina el agente de elución. En la tercera inyección, en la que han transcurrido aproximadamente tres horas, incluso pueden diferenciarse ya las últimas 5 isoformas (4-8 en Figura 2.9c), pero las primeras isoformas aún no recuperan el perfil original. De todos modos, aún cuando se lograra recuperar totalmente el perfil original, el empleo de estos eluyentes no parece demasiado práctico en términos de tiempo de análisis.

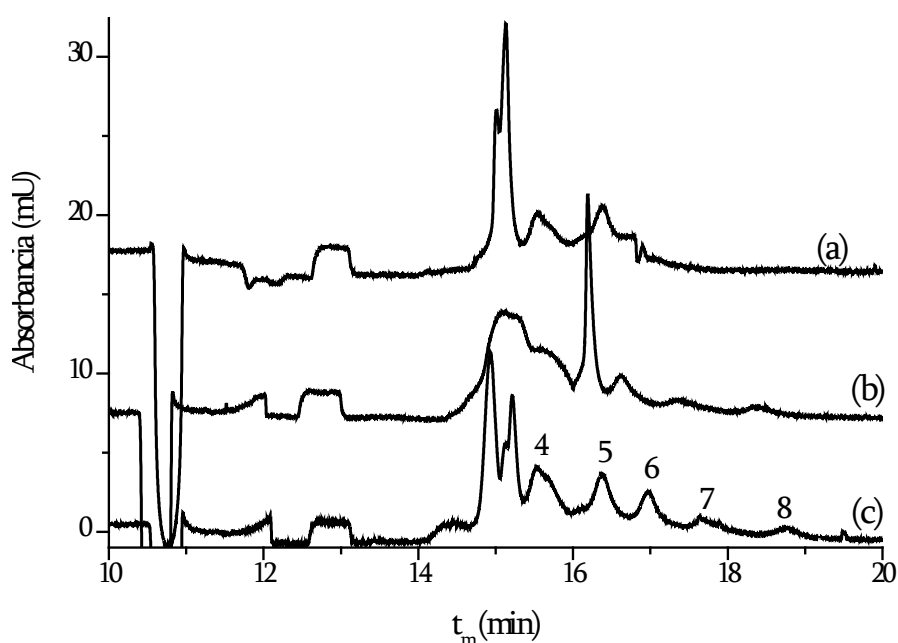


Figura 2.9. Análisis por CZE de inyecciones sucesivas de PSA eluído con glicina 0,4 M y urea 6 M a pH 9, conservado a 4°C entre inyecciones: (a) inmediatamente después de eliminar el agente de desorción, (b) aproximadamente 1 h después y (c) aproximadamente 3 h después. Condiciones electroforéticas como en la Figura 2.5.

Entre los agentes empleados por otros autores, el ácido propiónico ha mostrado su utilidad para eluir PSA [18, 21], por lo que éste fue el siguiente agente de desorción ensayado. En el presente estudio, la elución con ácido propiónico 1 M

produjo una recuperación de PSA patrón inyectado en la columna del 42%, ligeramente inferior al obtenido con la elución con Gly-HCl y generando un cromatograma de inmunoafinidad muy similar al obtenido con este último agente de desorción (Figura 2.10).

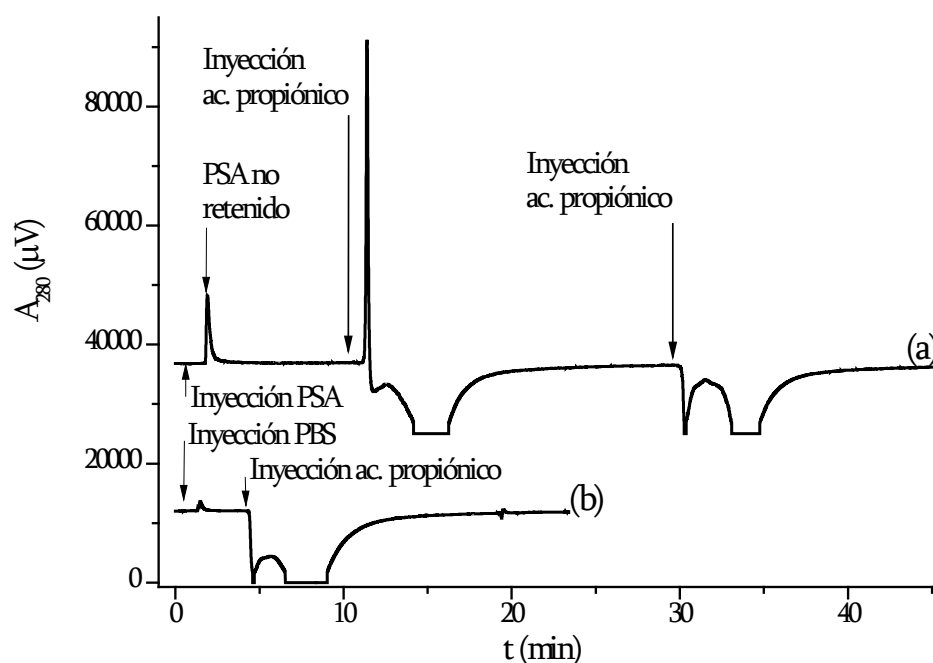


Figura 2.10. Cromatograma de inmunoafinidad para (a) PSA patrón y (b) un blanco. Elución con ácido propiónico 1 M. Condiciones: flujo 0,5 ml/min, monitorización a 280 nm.

El análisis por CZE de la fracción eluída con este agente y limpiada en el dispositivo Microcon, proporcionó perfiles repetitivos y prácticamente idénticos a los obtenidos para el PSA patrón que no se había sometido a ningún tratamiento. En la Figura 2.11, se puede observar la comparación de ambos perfiles, mostrándose en ambos casos la separación de 8 isoformas de PSA patrón.

Por otro lado, al igual que se había observado con el resto de eluyentes ensayados, una segunda inyección de agente de desorción no produjo elución adicional aparente de PSA retenido en la columna de IAC, como se puede observar en el cromatograma de la Figura 2.10a. La colección, neutralización, limpieza,

concentración y posterior análisis por CZE de esta segunda fracción eluída corroboró la ausencia de la glicoproteína en esta alícuota a concentración detectable en UV. El hecho de que solamente un 42% del PSA inyectado en la columna se recupere no está asociado a una posible sobrecarga de la columna de IAC, ya que, al igual que se había observado al empezar a utilizar la columna de IAC, el PSA no retenido supuso entre un 2,5 y un 5% del PSA inyectado, siendo el porcentaje de recuperación en las fracciones no retenida y retenida independiente de la cantidad inyectada de PSA (5 o 10 μg). La recuperación en cada inyección de PSA realizada en la columna tampoco sufrió aumento con el número de inyecciones, con lo que el posible PSA no eluído cada día no se extraía en recuperaciones posteriores.

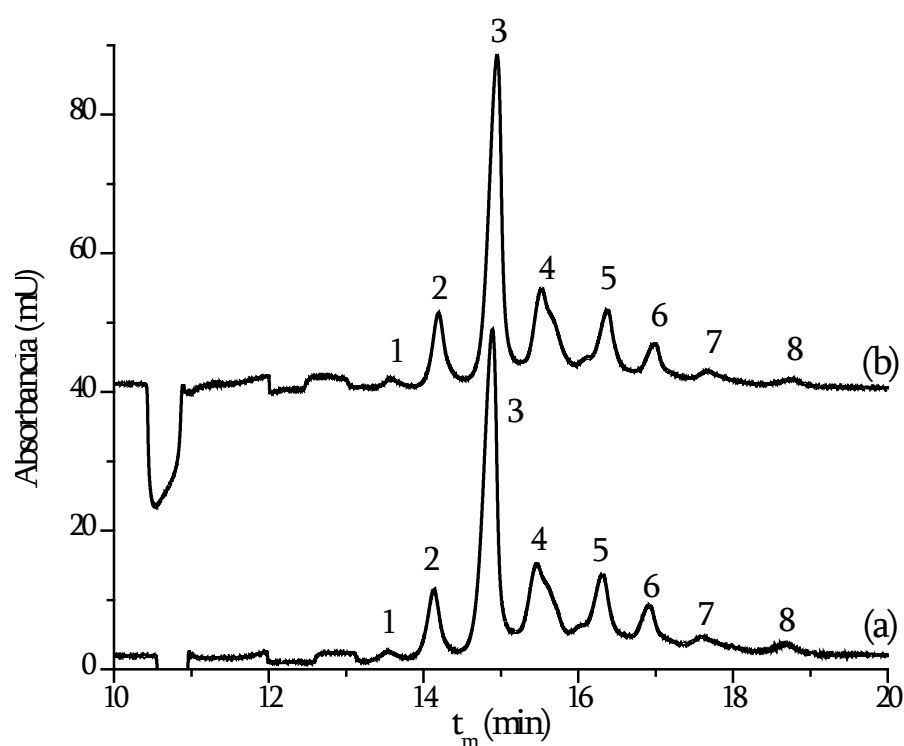


Figura 2.11. Análisis por CZE de (a) PSA patrón sin pasar por la columna de IAC y (b) PSA eluído de la columna de IAC con ácido propiónico 1 M. Condiciones electroforéticas como en la Figura 2.5.

Sin embargo, al principio de cada día fue necesaria una limpieza exhaustiva de la columna cromatográfica con repetidas inyecciones de eluyente hasta que se

obtenían cromatogramas repetitivos para los blancos de elución, antes de realizar la purificación de una muestra. Este hecho puede indicar que, debido a una posible interacción de gran estabilidad entre el PSA y el Ab empleado, la glicoproteína se desorbía del relleno cromatográfico lentamente. Las primeras inyecciones de eluyente realizadas cada día fueron colectadas, limpiadas en Microcon, concentradas y analizadas por CZE. En ningún caso se observó presencia de PSA en estas alícuotas, lo que podría indicar que, o bien la cantidad de PSA recuperada es baja, o que el PSA fuertemente retenido en la columna se extrae posteriormente muy degradado por las inyecciones de fase eluyente, sin que se puedan detectar sus isoformas por CZE.

Para tratar de mejorar la recuperación de PSA en el proceso de IAC, al favorecer la cinética de unión Ag-Ab en la etapa de captura y la cinética de disociación en la etapa de elución, se redujo el flujo de fase móvil de 0,5 a 0,2 ml/min empleando ácido propiónico como agente de desorción. Se observó que esta modificación no originaba variación en los porcentajes de PSA recuperado en las fracciones no retenida y eluída.

A la vista de los resultados obtenidos en términos de recuperación y conservación del perfil electroforético de isoformas de PSA, se seleccionó el ácido propiónico 1 M como agente de elución. El porcentaje de recuperación obtenido (42%) correspondía al proceso analítico global, incluyendo IAC, limpieza y concentración en los dispositivos Microcon y CZE. Con el fin de diferenciar la influencia de la etapa de IAC y de la etapa de tratamiento en Microcon sobre la recuperación obtenida, se realizó el siguiente experimento: una alícuota de PSA patrón (10 µg) se diluyó en ácido propiónico 1 M con un volumen de ácido semejante al que se recupera el PSA en el proceso de IAC, se neutralizó con Tris 1 M y se sometió al mismo proceso de limpieza y concentración aplicado a las alícuotas de PSA eluído de la columna de IAC. El análisis posterior por CZE de esta alícuota de PSA reveló que de este proceso de limpieza se recupera aproximadamente un 75% de la glicoproteína. Los ensayos realizados previamente sobre el PSA lavado solamente

con agua o PBS en Microcon previamente pasivado con Brij®35, mostraron una recuperación muy próxima al 100%. Por tanto, parece que el tratamiento de PSA con ácido propiónico y Tris favorece la adsorción irreversible de la glicoproteína al dispositivo de ultrafiltración. Lo mismo ocurre cuando se trata el PSA con Gly-HCl en Microcon, observándose en este caso una recuperación aún más baja, del 62%. Teniendo en cuenta la pérdida de PSA en la etapa de limpieza y concentración sobre el proceso global empleando ácido propiónico como eluyente, la recuperación de la etapa de IAC se estimó en un 56%, similar a la del método seleccionado (recuperación del 47%) en un amplio estudio realizado sobre inmunoextracción de PSA por IAC empleando diferentes anticuerpos unidos a sefarosa [21].

2.3.2.2. Evaluación del método de IAC optimizado

Se evaluó la repetibilidad en los análisis de CZE para el PSA eluido con ácido propiónico 1 M para un mismo proceso de purificación (intra-día) y tres procesos de purificación realizados en días distintos (inter-día) para alícuotas diferentes de PSA patrón. Los resultados se muestran en la Tabla 2.2. Los valores de repetibilidad tanto para t_m como para $\%A_{corr}$ fueron del mismo orden que los obtenidos en las mismas condiciones de CZE para el patrón de PSA sin el tratamiento de IAC (Capítulo 1, Tabla 1.5). La similitud en precisión fue tanto para los valores intra-día, como para los obtenidos en tres días diferentes. Este dato es muy positivo, ya que refleja la buena repetibilidad del proceso de purificación de PSA por IAC. Los bajos valores de RSD ponen de manifiesto la utilidad del método de IAC desarrollado para el análisis por CZE de isoformas de PSA.

Si se observan los valores obtenidos para ambos estudios, PSA patrón (Tabla 1.5) y tras purificación por IAC (Tabla 2.2), se pueden encontrar ligeras diferencias en las medias para los t_m de cada una de las isoformas en los cuatro grupos de datos. Este hecho puede deberse a variaciones en el EOF, cuya magnitud sería ligeramente superior para los análisis intra-día realizados con el patrón sin someter a la

purificación por IAC, lo que origina una disminución en los t_m de las distintas isoformas.

Tabla 2.2. Repetibilidad intra- e inter-día (n=3 en ambos casos) para los valores de t_m y porcentaje de área corregida (%A_{corr}) para las distintas isoformas de PSA eluído de la columna de IAC con ácido propiónico 1 M. Condiciones electroforéticas de análisis por CZE como en la Figura 2.5.

Isoforma	Intra-día ^a				Inter-día ^b			
	t_m		%A _{corr}		t_m		%A _{corr}	
	M (min)	RSD (%)	M (%)	RSD (%)	M (min)	RSD (%)	M (%)	RSD (%)
1	13,72	0,4	1,41	2,2	13,53	1,5	1,38	4,0
2	14,37	0,4	9,62	0,3	14,15	1,6	9,87	2,3
3	15,15	0,3	41,59	0,1	14,91	1,6	41,06	1,2
4	15,74	0,2	19,58	0,5	15,50	1,5	19,85	1,2
5	16,62	0,2	14,22	0,1	16,36	1,5	14,28	1,0
6	17,24	0,2	7,67	0,9	16,99	1,5	7,71	2,9
7	17,93	0,2	4,23	1,6	17,68	1,4	4,16	1,4
8	19,03	0,1	1,69	1,7	18,76	1,4	1,69	1,9

(a) Análisis de una misma alícuota de PSA eluído de la columna IAC, realizados el mismo día

(b) Análisis de tres alícuotas diferentes de PSA eluído de la columna IAC, purificadas en días diferentes

En la Tabla 2.3 se presentan los valores del cociente t_m/t_{EOF} obtenidos en los análisis intra- e inter-día realizados para ambos patrones (los valores de t_m se han tomado de las Tablas 1.5 y 2.2). Como es lógico, el empleo de t_m/t_{EOF} como parámetro de migración, conduce a resultados más repetitivos que el empleo de t_m , tanto al considerar RSD para cada ensayo, como al comparar los cuatro grupos de datos entre sí.

Tabla 2.3. Repetibilidad de los cocientes t_m/t_{EOF} obtenidos en los análisis intra- e inter-día (n=3 en ambos casos) para el patrón de PSA sin purificación por IAC y para el patrón retenido en la columna de IAC y eluido con ácido propiónico 1 M. Datos de t_m tomados de las Tablas 1.5 y 2.2, respectivamente.

Isoforma	t_m/t_{EOF} Intra-día ^a				t_m/t_{EOF} Inter-día ^b			
	PSA sin IAC		PSA con IAC		PSA sin IAC		PSA con IAC	
	M	RSD (%)	M	RSD (%)	M	RSD (%)	M	RSD (%)
1	1,27	0,1	1,29	0,1	1,27	0,2	1,29	0,4
2	1,33	0,0	1,35	0,1	1,32	0,4	1,35	0,5
3	1,40	0,1	1,42	0,1	1,40	0,4	1,43	0,6
4	1,45	0,1	1,48	0,2	1,45	0,5	1,48	0,6
5	1,54	0,1	1,56	0,2	1,53	0,5	1,56	0,6
6	1,59	0,1	1,62	0,2	1,59	0,5	1,62	0,6
7	1,66	0,1	1,68	0,2	1,66	0,7	1,69	0,5
8	1,77	0,1	1,79	0,3	1,76	0,7	1,79	0,6

(a) Análisis de una misma alícuota del patrón de PSA sin purificación por IAC o eluido de la inmunocolumna, realizados el mismo día

(b) Análisis de tres alícuotas diferentes del patrón de PSA sin purificación por IAC o eluido de la inmunocolumna, analizadas en días diferentes

Por otro lado, también se observaron diferencias en las proporciones de las distintas isoformas de PSA (%A_{corr}), cuando la glicoproteína patrón se analizó por CZE tras su paso por la columna de IAC (Tablas 1.5 y 2.2). Las diferencias observadas indicarían un enriquecimiento en las isoformas 2 y 3 y un descenso en la concentración de las isoformas 1, 4, 5, 6, 7 y 8, tras el proceso de IAC realizado con el PSA estándar. Tras esta observación se evaluó si las diferencias entre los valores de %A_{corr} para las isoformas de PSA, antes y después de someterlo al proceso de IAC, eran significativas. Para ello, se realizó un ensayo de comparación de resultados apareados, para n=3 y un nivel de significancia $\alpha=0,05$. El análisis de los valores del estadístico t de Student para las parejas de datos de %A_{corr} reveló diferencias significativas para todas las isoformas excepto para las mayoritarias, es decir las isoformas 3, 4 y 5. Esto podría atribuirse a una mayor afinidad del Ab empleado por las formas moleculares de PSA que migran bajo ciertas isoformas. Sin embargo, no se

puede descartar que los valores de RSD más elevados para las isoformas minoritarias pudieran estar influyendo en la integración de sus áreas y, por tanto, favorecer la aparición de esas diferencias significativas.

Los valores de resolución, obtenidos mediante la ecuación I.7 (apartado I.2.1.3) para las distintas isoformas separadas por CZE del PSA retenido y eluído de la columna de IAC con ácido propiónico se obtuvieron del mismo modo que se describió en el Capítulo 1, para el patrón sin pasar por la columna de inmunoadfinidad. Los valores obtenidos se encontraban en un intervalo 1,02-2,22, mayores que los obtenidos para el estándar sin someter al método IAC, que estaban en el intervalo 0,86-1,89 (Capítulo 1, Tabla 1.4). Este hecho podría explicarse en términos del propio proceso de inmunopurificación, ya que al someter al patrón al proceso de IAC, podrían eliminarse algunas impurezas presentes en el mismo y que quizá estuvieran comigrando con las isoformas de PSA en el proceso electroforético, o favorecieran su adsorción al capilar.

2.3.3. Aplicación a muestras de plasma seminal

En primer lugar, el método de IAC optimizado se aplicó a una muestra de plasma seminal procedente de un donante sano. Para ello, el fluido seminal clarificado (5 μ l) se diluyó 20 veces en PBS y se inyectó en la columna de IAC. El cromatograma de inmunoadfinidad obtenido para la muestra se puede ver en la Figura 2.12. En primer lugar se observa un pico de gran intensidad correspondiente a todos los componentes de la muestra que no quedan retenidos en la columna. Tras la recuperación de la línea de base, se inyectaron 0,6 ml de una disolución de limpieza de NaCl 1 M a fin de eliminar posibles uniones no específicas que se hayan producido tras el paso de todo el grueso de la muestra a través de la columna de inmunoadfinidad. El análisis por CZE de la elución del PSA retenido en la columna sin la etapa previa de limpieza con NaCl 1 M, producía un perfil de picos electroforéticos con muy poca resolución y tiempos de migración muy retrasados.

Por esa razón, se decidió incluir una etapa de lavado de la columna tras la inyección de la muestra de plasma seminal. El uso de NaCl para este fin ya lo habían descrito otros autores [21] y además, como se describe en este capítulo, ya habíamos visto en la optimización del eluyente que el NaCl 1 M no producía elución apreciable de PSA de la columna. A continuación se inyectó el ácido propiónico 1 M produciéndose la desorción del PSA retenido en la columna. Como ocurría con el patrón, una segunda inyección de eluyente no generó desorción adicional de PSA.

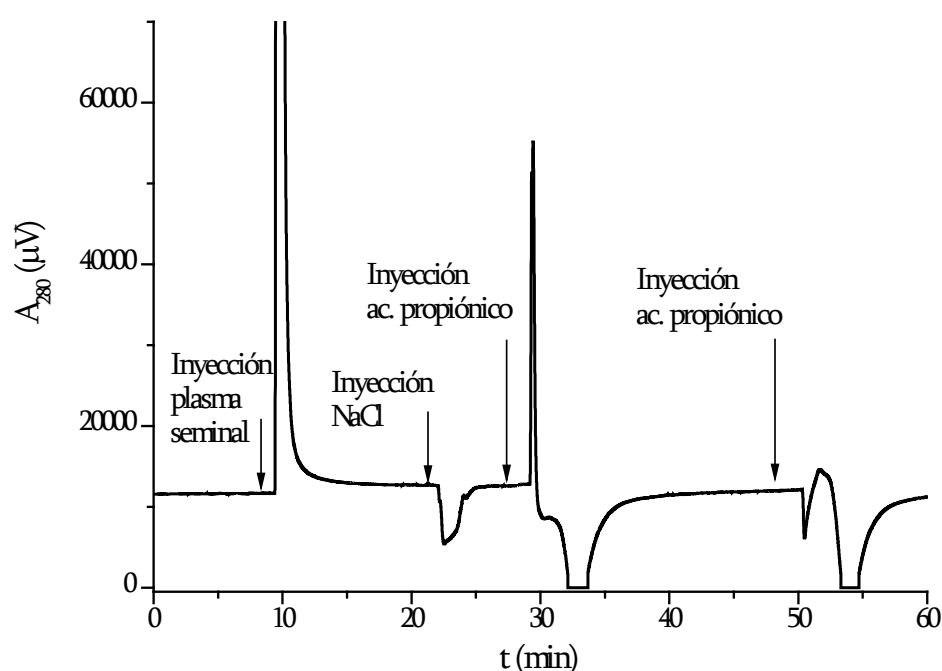


Figura 2.12. Cromatograma de inmunoafinidad para la muestra de plasma seminal, limpieza con NaCl 1 M y elución con ácido propiónico 1 M. Condiciones: flujo 0,5 ml/min, monitorización a 280 nm.

La Figura 2.13 muestra el resultado del análisis por CZE del PSA purificado a partir de plasma seminal. El perfil electroforético muestra la separación de 8 isoformas, igual que para el patrón, con resolución a línea de base para las primeras de ellas aunque ligeramente inferior para las de mayor tiempo de migración. De hecho, los valores de resolución para las distintas isoformas están en el intervalo 0,88-1,96, inferiores a los obtenidos para el patrón sometido al método de IAC pero

superiores a los obtenidos para el PSA patrón sin someter a este proceso. Otro hecho que se observa claramente son los t_m mayores que para el estándar, obtenidos tanto para el EOF como para las isoformas del PSA del plasma seminal, pudiendo indicar la presencia de posibles interferentes. Sin embargo, la posible presencia de esos interferentes no afecta irreversiblemente al correcto estado del capilar de electroforesis, ya que posteriores inyecciones del PSA estándar no produjeron retrasos en los t_m , ni para el EOF ni para las distintas isoformas.

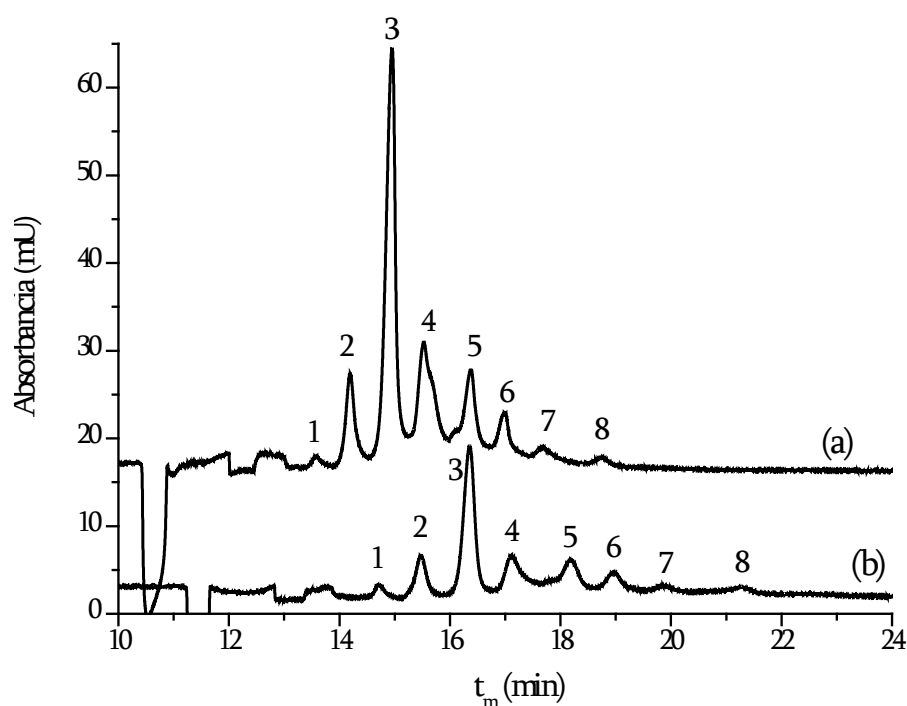


Figura 2.13. Análisis por CZE de (a) PSA patrón sometido al proceso de IAC y (b) PSA extraído del plasma seminal de un donante sano. Condiciones electroforéticas como en la Figura 2.5.

Posteriormente se trató de eliminar los posibles interferentes residuales en el PSA purificado de la muestra de plasma seminal. Para ello se empleó un procedimiento aplicado en el laboratorio con buenos resultados para la inmunopurificación de otra glicoproteína, la AGP [38, 39]. El método consiste simplemente en reinyectar en la columna de IAC la fracción colectada y neutralizada en la primera elución del PSA retenido, sometiendo así al PSA del plasma seminal a

dos procesos de inmunocaptura. Sin embargo, el análisis por CZE del PSA sometido al doble proceso de IAC, reveló que sólo aproximadamente el 20% del PSA en el plasma seminal se había recuperado de la segunda etapa de inmunocaptura, comparado con el análisis por CZE de una purificación simple previa. Asumiendo una recuperación del 42% para una sola etapa de inmunoextracción, se estimó que la recuperación global en el proceso doble de inmunocaptura era de un 8%. Aunque en este caso los t_m no se retrasan respecto al patrón, lo que indicaría que realmente se ha incrementado la pureza del PSA, la baja recuperación global no es adecuada para el análisis de isoformas de PSA por CZE con detección UV, ya que la señal de las isoformas minoritarias aparece por debajo del LOQ (Figura 2.14b).

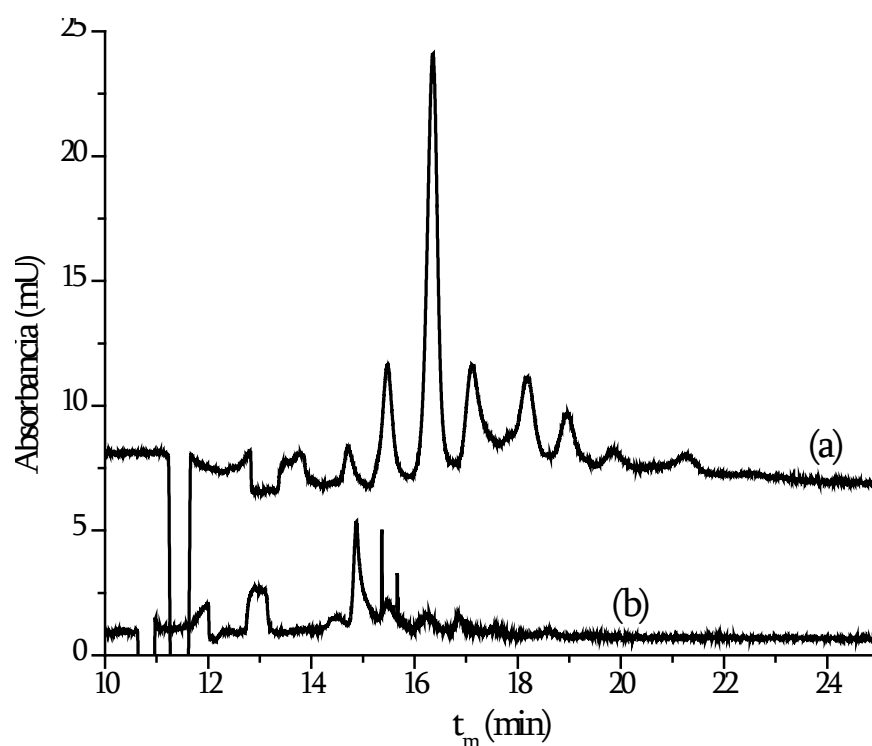


Figura 2.14. Análisis por CZE de (a) PSA extraído del plasma seminal en un solo proceso de IAC y (b) PSA extraído del plasma seminal en un doble proceso de IAC. Condiciones electroforéticas como en la Figura 2.5.

A continuación, se evaluó la repetibilidad en los análisis por CZE del PSA extraído de una misma alícuota de plasma seminal (intra-día). Como se puede ver en

la Tabla 2.4 y en la Figura 2.15, se obtuvo una buena repetibilidad para análisis intra-día, tanto para los cocientes t_m/t_{EOF} como para $\%A_{corr}$, con valores de RSD en los intervalos 0,2-0,3% y 0,8-4,9%, respectivamente. Lo mismo ocurre para análisis inter-día, es decir procedentes de las purificaciones realizadas a tres alícuotas diferentes del plasma seminal en tres días, con valores de RSD en los intervalos 1,0-1,3% y 0,6-5,3% para t_m/t_{EOF} y $\%A_{corr}$, respectivamente. La repetibilidad obtenida para las purificaciones del plasma seminal por el método IAC desarrollado es, en general, del mismo orden aunque ligeramente peor que la obtenida para el patrón comercial utilizado, lo que es fácil de entender teniendo en cuenta que el PSA adquirido ya ha pasado un proceso de purificación. Por tanto, los valores de RSD obtenidos tanto para t_m/t_{EOF} como para $\%A_{corr}$ son muy satisfactorios para fluidos biológicos, ya que se encuentran dentro de los intervalos considerados aceptables para análisis de proteínas patrón por CE.

Tabla 2.4. Repetibilidad intra- e inter-día (n=3 en ambos casos) para los valores de t_m , t_m/t_{EOF} y porcentaje de área corregida ($\%A_{corr}$) para las distintas isoformas de PSA purificado de plasma seminal por IAC. Condiciones electroforéticas como en la Figura 2.5.

Isoforma	Intra-día ^a						Inter-día ^b					
	t_m		t_m/t_{EOF}		$\%A_{corr}$		t_m		t_m/t_{EOF}		$\%A_{corr}$	
	M (min)	RSD (%)	M	RSD (%)	M (%)	RSD (%)	M (min)	RSD (%)	M	RSD (%)	M (%)	RSD (%)
1	15,13	0,8	1,28	0,2	3,16	4,9	14,95	2,0	1,29	1,3	3,33	4,4
2	15,98	0,8	1,35	0,2	10,00	1,8	15,76	2,2	1,37	1,1	10,46	5,3
3	16,91	0,5	1,43	0,2	35,18	0,9	16,68	2,2	1,45	1,1	35,47	1,1
4	17,71	0,8	1,50	0,2	16,77	0,8	17,49	2,3	1,52	1,2	16,51	2,7
5	18,85	0,8	1,59	0,2	15,92	1,3	18,60	2,5	1,61	1,1	15,93	0,6
6	19,70	0,9	1,66	0,2	9,70	0,8	19,42	2,8	1,68	1,1	9,39	3,7
7	20,69	0,9	1,75	0,2	5,72	1,9	20,35	2,9	1,76	1,0	5,43	5,2
8	22,18	0,9	1,87	0,3	3,57	2,3	21,85	3,1	1,89	1,2	3,49	2,0

(a) Análisis de una misma alícuota de plasma seminal.

(b) Análisis de tres alícuotas diferentes de plasma seminal, purificadas en días diferentes.

Por último, se comprobó que la inyección sucesiva de alícuotas de plasma seminal en la columna IAC no afectó a la capacidad de ésta, ya que la recuperación en purificaciones posteriores no se vio alterada. La repetibilidad obtenida en los análisis por CZE también indicó que la inyección del PSA purificado del plasma seminal no afectó a la regeneración y durabilidad del capilar.

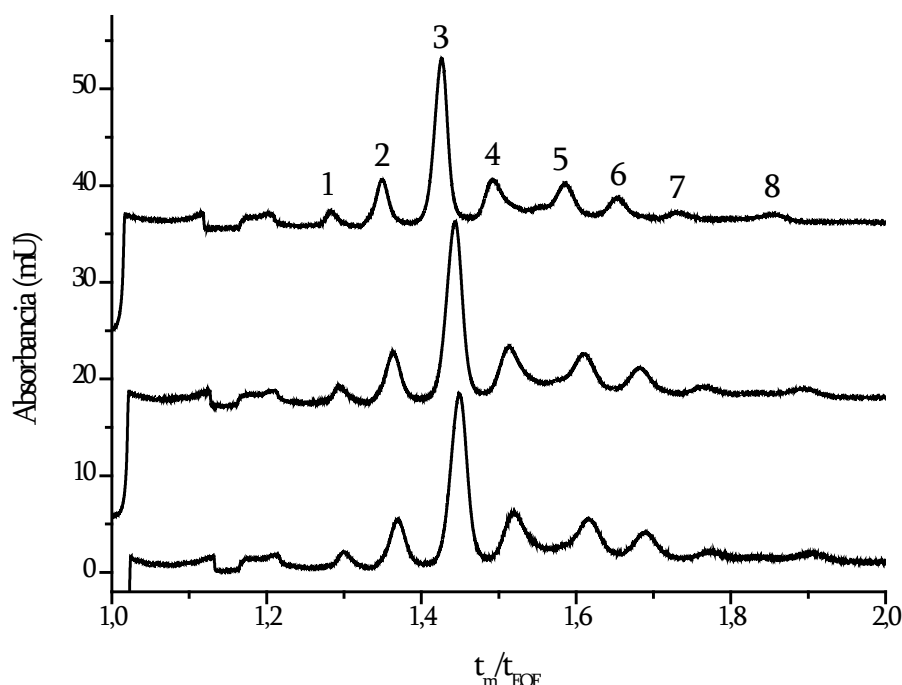


Figura 2.15. Análisis por CZE de PSA extraído de tres alícuotas de plasma seminal en tres días diferentes por IAC. Condiciones electroforéticas como en la Figura 2.5.

A continuación, se aplicó el método IAC a la muestra suministrada de fluido seminal de enfermo de cáncer de próstata. Esta muestra fue extraída de las vesículas seminales, dónde la concentración de PSA es mucho más baja que en el plasma seminal que atraviesa la próstata. La concentración de PSA en esta muestra fue determinada mediante el test ELISA correspondiente, con un valor de 57 $\mu\text{g/ml}$. Como era esperable, el método de IAC aplicado a 10 μl de esta muestra no permitió la detección de ninguna isoforma de PSA por CZE.

Posteriormente, empleando esta muestra de fluido seminal como matriz, se dopó con 10 μg de PSA estándar y se introdujo en la columna IAC. Este experimento mostró que la recuperación de la glicoproteína en el proceso de purificación es independiente de la matriz, obteniéndose el mismo valor que en el caso del patrón en dilución con PBS. Aplicando el valor de recuperación conocido y las áreas de pico obtenidas en CZE, se pudo estimar la concentración de PSA en el plasma seminal de sano en 1,3 mg/ml. Para obtener la misma cantidad de PSA en la purificación de la muestra de enfermo que en el caso de la muestra de sano, se necesitaron 150 μl del fluido seminal de enfermo de cáncer de próstata que se llevaron a 1,5 ml con PBS. Este volumen se inyectó en la columna de IAC y se trató de recuperar el PSA en la muestra. El análisis por CZE de la fracción retenida y eluída puso de manifiesto una baja purificación de la muestra, con un t_m para el EOF excepcionalmente retrasado y sin detección alguna de cualquiera de las isoformas de PSA. En este caso, la deficiencia en la purificación es muy probablemente debida al elevado volumen de muestra empleado para obtener una cantidad de PSA detectable en el análisis por CZE. La gran cantidad de plasma seminal inyectado en la columna conlleva una elevada concentración de impurezas en la fracción eluída y posteriormente concentrada, lo que produce un gran deterioro del análisis electroforético. En conclusión, este tipo de muestra de fluido seminal, extraído de las vesículas durante la intervención quirúrgica del tumor, no son compatibles con el método de purificación desarrollado y su aplicación al análisis de isoformas de PSA por CZE con detección UV, debido a su bajo contenido en la glicoproteína.

Por el contrario, el método de IAC aplicado a la muestra de plasma seminal procedente del eyaculado, permitió la purificación y el posterior análisis de las isoformas del PSA contenido en la muestra, empleando únicamente 5 μl de ésta, es decir, unos 6 μg de glicoproteína, lo que proporciona una S/N media en el análisis por CZE de 24 para la isoforma minoritaria. Por tanto, el método sería adecuado para

el estudio futuro de las isoformas de PSA en plasma seminal como potencial biomarcador del cáncer de próstata.

2.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

El método de IAC desarrollado representa un procedimiento simple y rápido para la purificación de PSA en muestras de plasma seminal, empleando alrededor de 20 minutos en el proceso cromatográfico y menos de dos horas y media en la etapa de ultrafiltración. Por otro lado, se realizaron al menos diez inyecciones de PSA patrón y ocho inyecciones de plasma seminal en la misma inmunocolumna, sin pérdida observable en la recuperación del PSA. La optimización del método se realizó empleando PSA patrón y estudiando el efecto de diferentes agentes de desorción sobre la recuperación y sobre el análisis por CZE de las isoformas del PSA eluído de la columna de IAC. El empleo de agentes desnaturalizantes como eluyentes mostró el efecto perjudicial que éstos producen sobre la resolución de las diferentes isoformas, mientras que los agentes basados en una fuerza iónica elevada no produjeron una recuperación detectable de la glicoproteína. De todos los agentes de desorción estudiados, únicamente el ácido propiónico 1M permitió la resolución por CZE de las 8 isoformas del PSA igual a la obtenida para el patrón sin someter a ningún tratamiento. El método de IAC permitió la recuperación de un 42% del patrón inyectado en la columna y los análisis por CZE del PSA eluído revelaron una buena repetibilidad tanto en t_m/t_{EOF} como en $\%A_{corr}$, para una misma alícuota de purificación y para diferentes procesos de inmunoextracción.

Finalmente, el método permitió la purificación de PSA de una muestra de plasma seminal, procedente de un individuo sano y el análisis de sus isoformas por CZE, también con una notable repetibilidad. Aunque este procedimiento conduce a t_m retrasados que pueden reflejar la posible presencia de impurezas en la muestra de

PSA, resulta adecuado para llevar a cabo el análisis por CZE de la glicoproteína, cuya concentración en la fracción eluída a partir de tan solo 5 microlitros de plasma seminal es suficientemente elevada para cuantificar las 8 isoformas previamente observadas para el patrón. En este sentido, el método podría proporcionar en el futuro una herramienta analítica adecuada para el estudio del perfil de isoformas de PSA como potencial biomarcador del cáncer de próstata. Para este fin, serían necesarias muestras de plasma seminal procedentes de enfermos de cáncer de próstata y pacientes con BPH.

2.5. REFERENCIAS

- [1] Monzo, A., Bonn, G. K., Guttman, A., *Trends Anal. Chem.* 2007, *26*, 423-432.
- [2] Fang, X., Zhang, W. W., *J. Proteomics* 2008, *71*, 284-303.
- [3] Jung, K., Cho, W., Regnier, F. E., *J. Proteome Res.* 2009, *8*, 643- 650.
- [4] Loo, D., Jones, A., Hill, M. M., *J. Proteome Res.* 2010, *9*, 5496-5500.
- [5] Jankovic, M. M., Kosanovic, M. M., *Clin. Biochem.* 2005, *38*, 58-65.
- [6] Tabares, G., Radcliffe, C. M., Barrabes, S., Ramirez, M., Aleixandre, R. N., Hoesel, W., Dwek, R. A., Rudd, P. M., Peracaula, R., de Llorens, R., *Glycobiology* 2006, *16*, 132-145.
- [7] Meany, D. L., Zhang, Z., Sokoll, L. J., Zhang, H., Chan, D. W., *J. Proteome Res.* 2009, *8*, 613-619.
- [8] Li, Y., Larsson, E. L., Jungvid, H., Galaev, I. Y., Mattiasson, B., *J. Chromatogr. A* 2001, *909*, 137-145.
- [9] Sparbier, K., Koch, S., Kessler, I., Wenzel, T., Kostrzewa, M., *J. Biomol. Tech.* 2005, *16*, 407-413.
- [10] Anderson, N. L., Anderson, N. G., *Mol. Cell Proteomics* 2002, *1*, 845-867.
- [11] Peracaula, R., Barrabes, S., Sarrats, A., Rudd, P. M., de Llorens, R., *Dis. Markers* 2008, *25*, 207-218.
- [12] Diamandis, E. P., *Trends Endocrinol. Metab.* 1998, *9*, 310-316.
- [13] White, K. Y., Rodemich, L., Nyalwidhe, J. O., Comunale, M. A., Clements, M. A., Lance, R. S., Schellhammer, P. F., Mehta, A. S., Semmes, O. J., Drake, R. R., *J. Proteome Res.* 2009, *8*, 620-630.
- [14] Drake, R. R., White, K. Y., Fuller, T. W., Igwe, E., Clements, M. A., Nyalwidhe, J. O., Given, R. W., Lance, R. S., Semmes, O. J., *J. Proteomics* 2009, *72*, 907-917.
- [15] Pilch, B., Mann, M., *Genome Biol.* 2006, *7*, R40.
- [16] Graves, H. C. B., Kamarei, M., Stamey, T. A., *J. Urol.* 1990, *144*, 1510-1515.
- [17] Babu, A. K. S., Vijayalakshmi, M. A., Smith, G. J., Chadha, K. C., *J. Chromatogr. B* 2008, *861*, 227-235.

- [18] Peter, J., Unverzagt, C., Lenz, H., Hoesel, W., *Anal. Biochem.* 1999, **273**, 98-104.
- [19] Prakash, S., Robbins, P. W., *Glycobiology* 2000, **10**, 173-176.
- [20] Mikolajczyk, S. D., Marker, K. M., Millar, L. S., Kumar, A., Saedi, M. S., Payne, J. K., Evans, C. L., Gasior, C. L., Linton, H. J., Carpenter, P., Rittenhouse, H. G., *Cancer Res.* 2001, **61**, 6958-6963.
- [21] Acevedo, B., Perera, Y., Torres, E., Penton, D., Ayala, M., Gavilondo, J., *Prostate* 2006, **66**, 1029-1036.
- [22] Dwek, M. V., Jenks, A., Leathem, A. J. C., *Clin. Chim. Acta* 2010, **411**, 1935-1939.
- [23] Perez, L., Zulueta, O., Melchor, A., Hernandez, L., Lopez, R., Cazanave, J., Bequer, D., *Hybridoma* 2011, **30**, 247-251.
- [24] Concejero, M. A., Galve, R., Herradon, B., Gonzalez, M. J., de Frutos, M., *Anal. Chem.* 2001, **73**, 3119-3125.
- [25] Puerta, A., Jaulmes, A., De Frutos, M., Diez-Masa, J. C., Vidal-Madjar, C., *J. Chromatogr. A* 2002, **953**, 17-30.
- [26] Puerta, A., Vidal-Madjar, C., Jaulmes, A., Diez-Masa, J.-C., de Frutos, M., *J. Chromatogr. A* 2006, **1119**, 34-42.
- [27] Ongay, S., Lacunza, I., Diez-Masa, J. C., Sanz, J., de Frutos, M., *Anal. Chim. Acta* 2010, **663**, 206-212.
- [28] Schiel, J. E., Mallik, R., Soman, S., Joseph, K. S., Hage, D. S., *J. Sep. Sci.* 2006, **29**, 719-737.
- [29] Puerta, A., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., *J. Immunol. Meth.* 2004, **289**, 225-237.
- [30] Moser, A. C., Hage, D. S., *Bioanalysis* 2010, **2**, 769-790.
- [31] Larsson, P.-O., *Meth. Enzymol.* 1984, **104**, 212-223.
- [32] Visser, N., Lingeman, H., Irth, H., *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, **382**, 535-558.
- [33] Mikolajczyk, S. D., Grauer, L. S., Millar, L. S., Hill, T. M., Kumar, A., Rittenhouse, H. G., Wolfert, R. L., Saedi, M. S., *Urology* 1997, **50**, 710-714.

- [34] Mikolajczyk, S. D., Millar, L. S., Wang, T. J., Rittenhouse, H. G., Wolfert, R. L., Marks, L. S., Song, W. T., Wheeler, T. M., Slawin, K. M., *Urology* 2000, *55*, 41-45.
- [35] Middelberg, A. P. J., *Trends Biotechnol.* 2002, *20*, 437-443.
- [36] Concejero, M. A., Abad, E., Rivera, J., Herradon, B., Gonzalez, M. J., de Frutos, M., *J. Sep. Sci.* 2004, *27*, 1093-1101.
- [37] Yarmush, M. L., Antonsen, K. P., Sundaram, S., Yarmush, D. M., *Biotechnol. Prog.* 1992, *8*, 168-178.
- [38] Ongay, S., Neusuess, C., Vaas, S., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2010, *31*, 1796-1804.
- [39] Puerta, A., Diez-Masa, J. C., Martin-Alvarez, P. J., Martin-Ventura, J. L., Barbas, C., Tuñon, J., Egido, J., de Frutos, M., *Analyst* 2011, *136*, 816-822.

Capítulo 3

*Derivatización fluorescente de glicoproteínas para el análisis
de sus isoformas por electroforesis capilar con detección por
fluorescencia inducida por láser*

ÍNDICE

3.1. INTRODUCCIÓN	207
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	212
3.2.1. Muestras y reactivos	212
3.2.2. Instrumentación	213
3.2.3. Métodos de derivatización fluorescente	215
3.2.3.1. Marcado no-covalente con NanoOrange	215
3.2.3.2. Derivatización covalente a través de grupos tiol	216
3.2.3.2.1. Protocolo de reacción con el fluoróforo 5-IAF	216
3.2.3.2.2. Protocolo de reacción con el fluoróforo BODIPY-IA	218
3.2.3.3. Derivatización covalente a través de grupos amino	219
3.2.4. Métodos de CZE	219
3.2.4.1. Análisis por CE-UV	219
3.2.4.2. Análisis por CE-LIF	220
3.2.4.3. Derivatización en-capilar y análisis por CE-LIF	221
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	222
3.3.1. Derivatización no-covalente	223
3.3.2. Derivatización covalente	227
3.3.2.1. Reacción a través de grupos tiol	227
3.3.2.1.1. Marcado con 5-IAF	229
3.3.2.1.1.1. Derivatización fluorescente de AGP en muestras biológicas	236
3.3.2.1.2. Marcado con BODIPY-IA	240
3.3.2.2. Reacción a través de grupos amino	245
3.3.2.2.1. Marcado con Chromeo P503	246
3.3.2.2.1.1. Procedimiento pre-capilar	247
3.3.2.2.1.2. Procedimiento en-capilar	258
3.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO	270
3.5. REFERENCIAS	275

3.1. INTRODUCCIÓN

Las muestras biológicas de plasma seminal o EPS son una excelente fuente de PSA para el análisis de sus isoformas, debido fundamentalmente a dos razones. En primer lugar, pueden reflejar mejor el estado fisiológico de la próstata que otras matrices, como por ejemplo la sangre, debido a su proximidad a la glándula. En segundo lugar, contienen una elevada concentración de la glicoproteína y la extracción de ésta de la muestra es factible para su estudio por CZE mediante una técnica tan selectiva como es la IAC, como se ha demostrado en el capítulo anterior. Pero este tipo de muestras es algo delicado de conseguir, especialmente por las connotaciones éticas y porque en ciertas ocasiones, su obtención podría causar dolencia al paciente, aunque algunos autores aseguran que la obtención de EPS no presenta ninguna contraindicación para el individuo [1].

En cualquier caso, debido a su fácil disponibilidad y rápida obtención, la sangre supone la matriz biológica más utilizada para el diagnóstico clínico [2]. Además, el suero y el plasma sanguíneos contienen una representación de todas las proteínas producidas por una gran parte de los tejidos del cuerpo humano, pudiendo utilizarse para detectar posibles estados fisiopatológicos de dichos tejidos [3]. Así, en el caso del estudio de isoformas de PSA en pacientes con cáncer de próstata, el suero sanguíneo ha sido la matriz biológica más empleada en los últimos años [4-10]. No obstante, también se han analizado las diferentes isoformas de PSA en orina, debido a su fácil obtención [11].

Por otro lado, la concentración de PSA en sangre u orina es extremadamente baja (del orden nM), por lo que aún combinada con una etapa de purificación y preconcentración, como la IAC, la detección UV no sería suficientemente sensible para el análisis de isoformas de PSA. Una solución sería utilizar un gran volumen de muestra en la etapa de preconcentración, pero en la mayoría de los casos esta alternativa es inviable, debido al elevado número y alta concentración de sustancias

interferentes que se encuentran en las muestras biológicas. Por lo tanto, sería necesaria una técnica de detección más sensible que permitiera el análisis de isoformas de PSA a tan bajas concentraciones. En este sentido, como ya se ha comentado en esta Memoria, la detección LIF es la técnica de monitorización más sensible empleada en CE, con la que se han llegado a alcanzar LODs del orden pM para proteínas [12, 13].

Como se ha descrito en detalle en la Introducción General, la detección LIF de proteínas en CE puede llevarse a cabo mediante tres estrategias diferentes: detección por fluorescencia nativa, detección por fluorescencia indirecta o derivatización fluorescente con reactivos fluoróforos o fluorogénicos. La derivatización fluorescente de proteínas se puede realizar de dos formas diferentes, covalente o no-covalente, dependiendo de la naturaleza de la unión del reactivo colorante. La derivatización por unión covalente es la estrategia más empleada para el análisis de proteínas por CE-LIF, aunque presenta dos importantes inconvenientes: la generación de múltiples productos de derivatización y la baja efectividad cuando se emplean muestras muy diluidas de proteínas. Dos modos posibles de evitar estos dos problemas serían el uso de la detección por fluorescencia nativa y la detección por fluorescencia indirecta.

Sin embargo, teniendo en cuenta las limitaciones de la fluorescencia nativa, aún cuando se han alcanzado LODs realmente bajos para algunas proteínas [14, 15], ésta no parece, a priori, una técnica de detección demasiado adecuada para el análisis de glicoproteínas con interés clínico, si éstas se encuentran a una concentración tan baja como la del PSA en sangre. El hecho de que la fluorescencia indirecta sea considerablemente menos sensible que la directa, ha propiciado que los métodos de derivatización fluorescente se hayan ido desarrollando para evitar los inconvenientes ya mencionados de este procedimiento.

La derivatización no-covalente es una alternativa interesante para la detección por LIF de proteínas debido a su simplicidad, lo que reduce el tiempo y el

esfuerzo para llevar a cabo el análisis [16]. En los últimos 20 años, se han empleado diversos colorantes y métodos de marcado no-covalente para la derivatización fluorescente de proteínas [14, 17-20]. Entre estos reactivos se encuentra el NanoOrange, que ha sido empleado en la derivatización fluorescente de diferentes proteínas para su análisis por CE-LIF tanto por el procedimiento en-capilar como en el post-capilar [21-23]. El NanoOrange es un colorante de tipo merocianina, que se une a la superficie de la proteína a través de regiones hidrófobas de ésta. La merocianina 540 (Figura 3.1) presenta una elevada solubilidad en agua, muestra un intenso efecto solvatocrómico y ha sido también empleada en la derivatización fluorescente en-capilar de algunas proteínas [24].

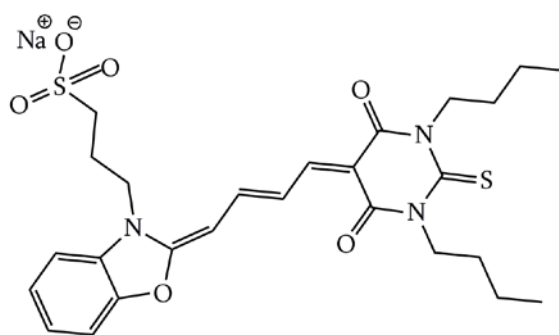


Figura 3.1. Estructura del colorante merocianina 540.

El NanoOrange presenta una débil emisión fluorescente cuando se encuentra libre en disolución acuosa, emisión que experimenta un aumento notable cuando se une de forma no-covalente a la proteína [25]. Por otro lado, la unión del NanoOrange a la proteína no parece modificar significativamente el pI de ésta, como se ha demostrado para la proteína BSA [26]. Sin embargo, el LOD alcanzado para las diferentes proteínas estudiadas aparece muy dispar en la bibliografía, ya que para HSA se ha descrito un LOD en el intervalo nM, mientras que para otras proteínas aparece en el intervalo μ M.

Por lo que se refiere a los inconvenientes de la derivatización fluorescente en forma covalente, las pérdidas de eficacia que produce en CE la generación de

múltiples productos de derivatización se han solucionado con la adición de un tensioactivo al BGE en concentración submicelar para separaciones por CZE de proteínas [12]. La dificultad aumenta cuando el análisis por CZE se aplica a la separación de isoformas de glicoproteínas, las cuales presentan características estructurales muy similares. La derivatización a través de grupos amino, el procedimiento más empleado, de las diferentes isoformas podría producir la separación de los diferentes productos de reacción, enmascarando la resolución de las isoformas obtenida para la glicoproteína nativa. Por otro lado, el empleo de tensioactivos para evitar la separación de los múltiples productos de derivatización, podría enmascarar también las diferencias de migración entre las isoformas, afectando a la separación por CE. Aunque en algunos casos la adición de un tensioactivo como SDS es necesaria para la separación de las isoformas de glicoproteínas, como ocurre para RibB o VEGF [27, 28], en el caso del PSA la adición de SDS a concentración mayor de 1 mM del tensioactivo en el BGE impide la resolución de isoformas de la glicoproteína, como se ha mostrado en el Capítulo 1 de esta Memoria.

Otra estrategia para minimizar la heterogeneidad en la derivatización, y el consecuente cambio en las propiedades electroforéticas de la proteína, es emplear un método de marcado selectivo. Por ejemplo, un tiempo corto de reacción produciría la derivatización únicamente de los grupos más accesibles. De este modo, Pinto y col. publicaron la separación de isoformas de una glicoproteína por CE-LIF, mediante el marcado de ovoalbúmina a través de grupos amino con FQ con un tiempo de reacción de 15 segundos [29]. Para tiempos de reacción mayores, de al menos 1 minuto, la resolución se pierde casi por completo. Sin embargo, tiempos cortos de reacción conducen a una sensibilidad menor.

El marcado a través de los grupos tiol de proteínas empleando derivados fluorescentes de iodoacetamida es otro procedimiento que se ha empleado para mejorar la selectividad en la reacción de derivatización [16, 30, 31]. El grupo

iodoacetamida reacciona rápidamente y presenta una elevada selectividad por los grupos tiol [32], lo que añadido a la baja abundancia relativa que presentan los grupos tiol frente a los grupos amino en proteínas, puede hacer de este procedimiento una opción para reducir la probabilidad de formación múltiple de derivados fluorescentes. Los colorantes 5-IAF y su homólogo 6-IAF, han sido empleados en la derivatización fluorescente de péptidos y proteínas [33-35]. Por otro lado, el derivado BODIPY-IA también ha sido empleado satisfactoriamente en el marcado fluorescente de proteínas [36, 37].

En los últimos años, se han empleado unos reactivos fluorogénicos, derivados de pirilio, para el análisis de proteínas por CE-LIF que reaccionan con los grupos amino de la lisina cargados positivamente para introducir una nueva carga positiva, por lo que en principio no modifican el pI de la proteína [38-40].

Para abordar el otro gran inconveniente, la derivatización fluorescente de proteínas en disoluciones muy diluidas (del orden nM), también se han planteado diferentes estrategias. Una de ellas fue el marcado en un reactor de fase sólida, en el que se inmovilizaba la proteína y por el que se hacía pasar una gran cantidad del agente fluorogénico FQ. Con este método se conseguía derivatizar insulina cuando su concentración en la muestra era de 10^{-8} M [41], mejorando el LOD en al menos dos órdenes de magnitud respecto a la detección UV. Con el mismo agente de derivatización, otra estrategia basada en la derivatización en-capilar permitía el marcado de β -lactoglobulina cuando la concentración en la muestra era del orden nM [42], o incluso del orden pM para el caso de ovotransferrina [12]. Los derivados de pirilio, antes mencionados, similar a lo que ocurre con el FQ, presentan una cinética muy rápida. Se han empleado para la derivatización de algunas proteínas como inmunoglobulina G, HSA, lipasa y mioglobina, en este caso en un procedimiento pre-capilar, a concentraciones del orden nM y hasta pM para el caso concreto de la HSA [38]. Hasta la fecha, no existen antecedentes en la bibliografía

que describan derivatización con reactivos derivados de pirilio de ninguna glicoproteína diferente de inmunoglobulinas a estos niveles de concentración.

El objetivo del trabajo recogido en este Capítulo fue la derivatización de PSA con reactivos fluoróforos o fluorogénicos, de modo que permitiera la separación por CZE de isoformas de PSA derivatizado, de forma similar a la separación lograda para la glicoproteína nativa por los diferentes métodos presentados en el Capítulo 1. Se ensayaron métodos de derivatización tanto no-covalente como covalente, estudiándose el marcado tanto en modo pre-capilar como en modo en-capilar. A fin de contar con referencias en el desarrollo de los procedimientos de derivatización, algunos de los métodos se aplicaron previamente a otras proteínas séricas humanas como modelos, HSA como proteína hidrófoba y AGP como glicoproteína con elevada heterogeneidad.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Muestras y reactivos

Los patrones de proteína empleados para el desarrollo de los métodos de derivatización fluorescente fueron el Patrón Europeo *BCR 613* de PSA, purificado de plasma seminal humano (*Resource Technology*, Salisbury, Reino Unido) y los patrones de AGP y HSA, obtenidos de plasma sanguíneo humano (*Sigma-Aldrich*, Steinheim, Alemania). Los sólidos liofilizados de estos patrones se disolvieron en agua hasta una determinada concentración (disoluciones madre) y se conservaron a -20°C en el caso del PSA y 4°C en los casos de AGP y HSA.

Las muestras biológicas empleadas para la purificación y posterior derivatización fluorescente de AGP correspondieron a suero humano, extraído por el procedimiento estándar en el Hospital Ramón y Cajal (Madrid) y secretoma de sección arterial proporcionado por la Fundación Jiménez Díaz (Madrid). La muestra

de secretoma fue obtenida por incubación, durante 24 horas a 37°C en un medio de cultivo celular RPMI libre de suero sanguíneo, de una sección de tejido arterial conteniendo placa de ateroma, procedente de un paciente con aneurisma aórtico abdominal. La AGP presente en ambos medios, suero y secretoma, se purificó por IAC mediante el procedimiento de doble purificación desarrollado en el laboratorio donde se ha realizado esta Tesis y recientemente publicado [43-45].

Los reactivos 5-(iodoacetamida)fluoresceína (5-IAF), tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), bicarbonato amónico, ditiotreitól (DTT), iodoacetamida, tricina, urea, putrescina, bromuro de decametónio, tetraborato sódico e isotiocianato de fluoresceína (FITC) fueron adquiridos en *Sigma-Aldrich*. Los compuestos hidróxido sódico, acetonitrilo, cloruro sódico, acetato sódico, ácido acético, dihidrogenofosfato sódico, ácido clorhídrico y metanol fueron suministrados por *Merck* (Darmstadt, Alemania). El fluoróforo N-((4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-boro-3a,4a-diazo-s-indaceno-3-il)metil) iodoacetamida, comercialmente conocido como BODIPY® FL C₁-IA (BODIPY-IA) y el colorante fluorogénico NanoOrange® fueron proporcionados por *Invitrogen* (Carlsbad, CA, Estados Unidos). El recubrimiento comercial para capilares de sílice, UltraTrol® LN fue adquirido en *Target Discovery* (Palo Alto, CA, Estados Unidos). Por último, el reactivo fluorogénico Chromeo™ P503 (P503) fue suministrado por *Active Motif* (Tegernheim, Alemania).

Todas las disoluciones de trabajo se prepararon con agua de calidad ultrapura Milli-Q® obtenida con un sistema de purificación de *Millipore* (Bedford, MA, Estados Unidos). A excepción de las muestras y patrones de proteínas, todas las disoluciones se filtraron antes de su uso, mediante filtros de jeringa con membrana de nylon de tamaño de poro de 0,2 µm adquiridos en *Teknokroma* (Barcelona).

3.2.2. Instrumentación

Para las separaciones por CZE se empleó el mismo equipo de CE citado en los capítulos anteriores, modelo G1600AX de *Agilent Technologies* (Waghausel,

Alemania), provisto de un detector UV-Vis de regleta de diodos. El control del instrumento y la colección de datos se realizaron a través del software *3D-CE Chemstation*, también de *Agilent Technologies*.

La detección LIF en las separaciones por CZE se realizó mediante un detector modelo *ZLIF Discovery* adquirido a *Picometrics* (Toulouse, Francia), conectado al equipo de CE a través de un convertidor analógico/digital 35900E de *Agilent Technologies*, para llevar a cabo la adquisición de datos del detector LIF. Como fuente de excitación se empleó un láser del tipo DPSS modelo PC 13589 fabricado por *Spectra Physics* (Mountain View, CA, Estados Unidos), con una potencia nominal de salida de 20 mW a 488 nm, cuyo haz de excitación se condujo a través de fibra óptica hasta la ventana de detección del capilar. La fluorescencia colectada se condujo, también a través de fibra óptica, hasta un filtro de corte de paso largo instalado en el detector, donde la radiación con una longitud de onda superior a 498 nm se atenúa (especificaciones de *Picometrics*), con el fin de impedir que la luz de excitación llegue al PMT. La tensión de polarización del PMT fue de 700 V.

Los espectros de fluorescencia se registraron a una longitud de onda de excitación de 488 nm, en un espectrómetro de fluorescencia modelo LS55 de *Perkin Elmer* (Waltham, MA, Estados Unidos).

Las separaciones por CE-UV se realizaron en capilares de sílice fundida sin recubrir suministrados por *Polymicro Technologies* (Phoenix, AZ, Estados Unidos), con 50 y 375 μm de diámetros interno y externo, respectivamente. Los capilares utilizados para los análisis por CE-LIF, de las mismas características que los anteriores, fueron adquiridos a *Picometrics* y en este caso poseían unas longitudes efectiva y total de 51 y 70 cm, respectivamente. Estos capilares se suministraron además con una lente elipsoide de material polimérico, adherida a la ventana de detección del capilar para permitir la colección de la fluorescencia (Figura 3.2).

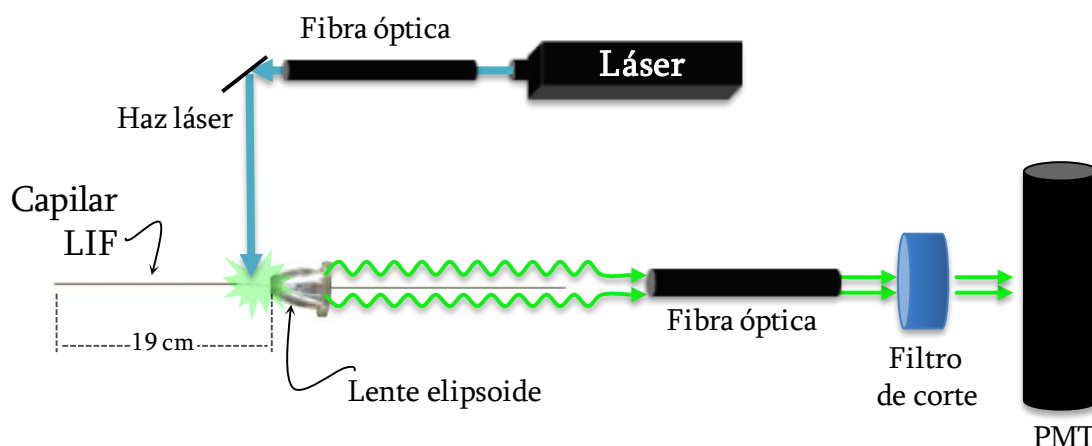


Figura 3.2. Esquema del detector LIF.

3.2.3. Métodos de derivatización fluorescente

La derivatización en el procedimiento pre-capilar se aplicó para todos los colorantes empleados, NanoOrange®, 5-(iodoacetamida)fluoresceína, BODIPY® FL C₁-IA y Chromeo™ P503, mientras que la derivatización en-capilar se aplicó para los colorantes fluorogénicos, NanoOrange® y Chromeo™ P503. A continuación se describen los protocolos de derivatización aplicados para cada reactivo colorante. Las disoluciones de todos los reactivos, así como las disoluciones de trabajo de patrones de proteínas, fueron preparadas diariamente.

3.2.3.1. Marcado no-covalente con NanoOrange

El protocolo de marcado no-covalente con NanoOrange que proporciona el fabricante, que incluye el calentamiento de la proteína a 95°C en presencia de un tensioactivo, fue modificado a fin de evitar la desnaturalización del PSA, ya que, como se ha comentado a lo largo de esta Memoria, este fenómeno puede alterar el perfil electroforético de isoformas de la glicoproteína. Las disoluciones de proteínas patrón de HSA 1 µg/ml y PSA 15 µg/ml se prepararon a partir de las disoluciones madre correspondientes por dilución con tampón tetraborato sódico 30 mM y

dihidrogenofosfato sódico 10 mM a pH 9,0. El colorante se suministra en una solución de dimetil sulfóxido, según el fabricante, en una concentración 500 veces superior a la concentración habitual de trabajo, es decir, 500x (el fabricante no especifica la concentración exacta del colorante en la solución comercial). Esta solución de concentración desconocida se añadió a 200 µl de las disoluciones de trabajo de las proteínas, para obtener una concentración final de colorante de 1x para el marcado de HSA y de 2x en el caso del PSA. Por otro lado, las cantidades de solución comercial de colorante añadidas resultan en unas concentraciones de dimetil sulfóxido en la mezcla de reacción de 0,2 y 0,4%, respectivamente. El marcado fluorescente se realizó a temperatura ambiente durante 30 minutos, según un procedimiento publicado [46], tras lo cual se registraron sus espectros de fluorescencia y/o se inyectaron en el sistema de CE-LIF.

El procedimiento de marcado en-capilar de PSA con NanoOrange se describe más adelante en el apartado 3.2.4.3.

3.2.3.2. Derivatización covalente a través de grupos tiol

3.2.3.2.1. Protocolo de reacción con el fluoróforo 5-IAF

Para la derivatización de AGP con el reactivo 5-IAF se emplearon 10 y 5 µl de disoluciones del patrón de glicoproteína de 16,7 y 0,3 mg/ml, respectivamente, en tampón bicarbonato amónico 0,1 M (pH sin ajustar), a las cuales se añadieron 30 y 5 µl de disoluciones de TCEP de concentraciones 1,1 y 0,06 mM, respectivamente, también en bicarbonato amónico 0,1 M. En estas condiciones, los puentes disulfuro de la AGP fueron reducidos a 37°C durante 1 hora. A continuación, los grupos tiol de la glicoproteína se hicieron reaccionar con el colorante a 37°C durante 2 horas y 30 minutos. El colorante 5-IAF se añadió en una disolución de bicarbonato amónico 0,1 M y acetonitrilo al 20%, para garantizar la completa disolución del reactivo, obteniéndose una cantidad final del disolvente orgánico en la mezcla de reacción del

10%. Las cantidades de colorante añadidas fueron, 40 μ l de una disolución 11 mM (para el caso de AGP 16,7 mg/ml) y 10 μ l de una disolución 0,4 mM (para el caso de AGP 0,3 mg/ml). La reacción de derivatización se detuvo por adición de 5 μ l de una disolución de DTT 1 M, manteniendo la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos más.

El marcado de PSA con 5-IAF se realizó mediante el mismo protocolo llevado a cabo con AGP, salvo modificaciones para ajustar los equivalentes de TCEP y colorante. Se añadieron 10 μ l de una concentración 0,33 mM de TCEP a 10 μ l de PSA 1 mg/ml, ambas disoluciones en bicarbonato amónico 0,1 M (pH sin ajustar). La reducción de los puentes disulfuro se realizó a 37°C durante 1,5 h. A continuación, se añadieron 10 μ l del colorante a una concentración de 10 mM en bicarbonato amónico 0,1 M y acetonitrilo al 10%, obteniéndose una concentración final del disolvente orgánico del 3%. La reacción de derivatización se completó en 3 h a 37°C, tras lo cual se añadieron 5 μ l de DTT 1 M para detener la reacción y se mantuvo la mezcla 30 minutos más a temperatura ambiente.

Para la derivatización fluorescente de AGP extraída de las muestras biológicas se empleó exactamente el mismo protocolo que el empleado para el patrón, salvo los volúmenes de reacción y la concentración de reactivos. Los volúmenes de muestra correspondieron a 5 μ l en ambos casos, AGP purificada de suero y secretoma, que fueron diluidos con 15 μ l de una disolución de TCEP 0,6 mM en bicarbonato amónico 0,1 M (pH sin ajustar), en el caso del suero y con 5 μ l de otra disolución de TCEP 0,06 mM en bicarbonato amónico 0,2 M (pH sin ajustar), en el caso del secretoma. La reacción de derivatización con 5-IAF se llevó a cabo por adición de 20 μ l del colorante en una concentración 4,9 mM, en el caso de la AGP procedente de suero, y 10 μ l en una concentración 0,4 mM, para el caso de la AGP procedente del secretoma.

En todos los casos, el exceso de reactivos se eliminó mediante ultrafiltración en dispositivos Microcon, con una membrana de tamaño de corte nominal de 10

kDa, en centrífuga a 4°C y 14.000 x g durante 30 minutos. Posteriormente, el volumen retenido se limpió bajo las mismas condiciones de centrifugación, dos veces con 100 µl de una disolución de bicarbonato amónico 0,1 M, seguidas de repetidas veces con agua hasta que no se observó color en el filtrado. Finalmente, la proteína derivatizada se recuperó del dispositivo en volúmenes aproximados de 25-30 µl para las proteínas patrón, 20 µl para la AGP procedente de suero y 5 µl para la AGP procedente del secretoma.

3.2.3.2.2. Protocolo de reacción con el fluróforo BODIPY-IA

La derivatización con BODIPY-IA se llevó a cabo para los patrones de AGP y PSA mediante el mismo procedimiento empleado en el marcado con 5-IAF, es decir, primero la reducción de los puentes disulfuro con TCEP y a continuación la reacción con el colorante, a la misma temperatura, durante los mismos tiempos y empleando los mismos volúmenes de reacción que con el derivado de fluoresceína.

El patrón de AGP, a una concentración de 16,7 mg/ml, se derivatizó con diferentes excesos del colorante BODIPY-IA, para lo que se añadieron diferentes concentraciones del reactivo (10,1, 4,3 y 2,1 mM) en bicarbonato amónico 0,1 M (pH sin ajustar) y acetonitrilo al 50%. En el caso del PSA, la glicoproteína en concentración 1 mg/ml se hizo reaccionar también con diferentes concentraciones del colorante (1,7, 3,3, 6,6 y 9,9 mM) en bicarbonato amónico 0,1 M y acetonitrilo al 75%. En ambos casos, tanto en la derivatización de AGP como en la de PSA, la concentración final de acetonitrilo en la mezcla de reacción correspondió al 25%, superior que en el caso de la 5-IAF, debido a la menor solubilidad del BODIPY-IA en disoluciones acuosas.

Las glicoproteínas derivatizadas con BODIPY-IA se purificaron igualmente en el dispositivo Microcon, de 10 kDa de tamaño de corte nominal, en las mismas condiciones empleadas para el reactivo 5-IAF. En el caso del BODIPY-IA, fue necesario un lavado adicional del dispositivo con 100 µl de etanol al 70%, previo a

los lavados finales con agua, debido nuevamente a la baja solubilidad del colorante en agua.

3.2.3.3. Derivatización covalente a través de grupos amino

La derivatización fluorescente de PSA a través de sus grupos amino se realizó por reacción con el colorante fluorogénico Chromeo P503 en dos procedimientos diferentes, pre-capilar y en-capilar.

La reacción pre-capilar se llevó a cabo sobre 20 μ l de PSA en concentraciones de 0,05, 0,25, 0,5 y 1 mg/ml en tampón tetraborato sódico 2,5 mM (pH 9,2), a los que se añadieron 5 μ l de Chromeo P503 de concentraciones 0,25, 1,25, 2,5 y 5 mM, respectivamente, en tampón tetraborato sódico 2,5 mM y un 10% de metanol, salvo que se indique lo contrario, obteniendo una concentración final del disolvente orgánico del 2%. Se optimizaron los parámetros de reacción, relación colorante/proteína, tiempo y temperatura de reacción.

El procedimiento de derivatización en-capilar del PSA con Chromeo P503 se describe más adelante, en el apartado 3.2.4.3.

3.2.4. Métodos de CZE

3.2.4.1. Análisis por CE-UV

Los capilares utilizados para los análisis por CE-UV fueron en todos los casos de 51 cm de longitud efectiva y 59,5 cm de longitud total, con un diámetro interno de 50 μ m. El acondicionado de los capilares nuevos se realizó como se describió en el Capítulo 1 (apartado 1.2.3), modificando ligeramente los tiempos de lavado en el protocolo descrito para el acondicionamiento entre inyecciones. La secuencia de lavados en este último caso fue: 3 min con agua, 7 min con hidróxido sódico 0,1 M, 3 min con agua y finalmente 5 min con BGE. Todas las separaciones por CE-UV se llevaron a cabo a 35°C y 21,2 kV (357 V/cm) y la inyección hidrodinámica se realizó

a 35 mbar durante 25 s (≈ 32 nl), salvo que se indique lo contrario. Para las separaciones de isoformas de AGP, se empleó un BGE optimizado anteriormente en el laboratorio [47]. En este caso, salvo que se indique lo contrario, el BGE consistió en tricina 10 mM, acetato sódico 10 mM, cloruro sódico 10 mM, urea 7 M y putrescina 4,5 mM ajustado a pH 4,5 por la adición de ácido acético 2 M. En el caso de las separaciones de isoformas de PSA, el BGE consistió en tetraborato sódico 5 mM, dihidrogenofosfato sódico 10 mM y bromuro de decametonio 2 mM a pH 9,0.

3.2.4.2. Análisis por CE-LIF

Los capilares LIF empleados fueron de 50 μm de diámetro interno y de dos longitudes diferentes, en función del recubrimiento dinámico empleado. En el caso de separaciones con EOF, las longitudes efectiva y total fueron de 51 y 70 cm, respectivamente. Por otro lado, cuando se empleó UltraTrol LN para la supresión del EOF los capilares utilizados fueron de 14,5 y 33,5 cm de longitudes efectiva y total, respectivamente. La longitud efectiva en ambos casos viene determinada por la configuración del cartucho suministrado para alojar los capilares LIF, con una longitud predeterminada desde la ventana de detección hasta el extremo de salida del capilar de 19 cm (Figura 3.2) y una longitud efectiva mínima de 14,5 cm, la empleada para las separaciones con UltraTrol LN. El acondicionado para capilares nuevos y los protocolos de lavado entre inyecciones, fueron exactamente los mismos que se aplicaron para los capilares empleados en el trabajo descrito en el Capítulo 1 (apartado 1.2.3).

Adicionalmente y previo al análisis de las proteínas derivatizadas, se estimó el LOD instrumental correspondiente al sistema de detección LIF. Para ello, se realizó el análisis por CZE de un patrón fluorescente, FITC a una concentración 0,1 nM, según el protocolo que indica el fabricante del detector. El análisis se realizó a 25°C y 30 kV en un capilar de 50 μm de diámetro interno y el BGE empleado consistió en un tampón carbonato/bicarbonato 25 mM a pH 9,6. La inyección hidrodinámica se

realizó a 50 mbar durante 30 s, que en un capilar de 70 cm corresponde a un volumen de 36,9 nl y una masa inyectada de FITC de 3,7 amol. El análisis repetitivo del FITC 0,1 nM produjo un LOD instrumental estimado en $9,4 \pm 0,6$ pM ($n=5$), para $S/N = 3$.

Las separaciones de AGP por CE-LIF se realizaron a 35°C y 25 kV (357 V/cm) y la inyección hidrodinámica se llevó a cabo a 35 mbar durante 30 s. El BGE correspondiente a estas separaciones fue idéntico al empleado para las separaciones por CE-UV de esta misma glicoproteína, indicado en el apartado 3.2.4.1. Los análisis de PSA derivatizada covalentemente por CE-LIF en presencia de EOF se realizaron en las mismas condiciones que la AGP, excepto el BGE que correspondió al empleado también en las separaciones por CE-UV del PSA, indicado en el apartado 3.2.4.1, salvo que se indique lo contrario.

3.2.4.3. Derivatización en-capilar y análisis por CE-LIF

Para tratar de derivatizar el PSA con el colorante NanoOrange en un procedimiento en-capilar, se utilizaron capilares para LIF recubiertos con UltraTrol LN, descritos en el apartado anterior. El colorante se añadió al BGE en concentraciones 1x y 2x, preparado por dilución de la solución comercial. En estas condiciones de supresión del EOF, el BGE consistió en tetraborato sódico 30 mM y dihidrogenofosfato sódico 10 mM a pH 9,0, ya descrito en el Capítulo 1 de esta Memoria. La inyección hidrodinámica de muestra se realizó a 35 mbar durante 30 s. Tras la inyección, el marcado fluorescente en-capilar y la movilización de la glicoproteína se realizaron a 20°C y -20 kV.

Los procedimientos de derivatización covalente en-capilar de PSA con el colorante Chromeo P503 se llevaron a cabo en capilares para LIF. Para ello, se aplicaron las mismas condiciones que en la separación de isoformas de PSA derivatizada, en condiciones de presencia de EOF, con algunas modificaciones a las mencionadas anteriormente en el apartado 3.2.4.2. En primer lugar, se inyectó un

plug de PSA en tampón tetraborato sódico 2,5 mM (pH sin ajustar), seguido de la inyección de un *plug* de Chromeo P503 2,5 mM en tampón tetraborato sódico 2,5 mM (pH sin ajustar) con un 10% de metanol. El tiempo de inyección a 35 mbar de cada reactivo se varió a fin de controlar la longitud de cada *plug* de muestra o reactivo y optimizar la reacción. A continuación, se aplicó el voltaje de mezcla, el cual permitía la mezcla de los *plugs* de reactivos. En este sentido, se estudió el efecto de diferentes voltajes en el intervalo 1-6 kV, así como el efecto de los tiempos en que se aplicaron. Finalmente, se apagó el campo eléctrico, se dejó la mezcla reaccionar durante un tiempo (tiempo de reacción), que se varió entre 0 y 60 minutos, y se aplicó después el voltaje para llevar a cabo la separación.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La derivatización fluorescente de PSA se trató de llevar a cabo por tres vías diferentes. La primera de ellas, no-covalente, por medio de un colorante flurogénico denominado comercialmente NanoOrange el cual se aplicó también a una proteína humana de referencia en numerosos procedimientos analíticos, la HSA, a modo de control de la derivatización no-covalente. La segunda tentativa de marcado fluorescente fue a través de una derivatización covalente de los grupos tiol de la glicoproteína. En este caso, se escogió como referencia la AGP, glicoproteína de gran heterogeneidad y estudiada también como potencial biomarcador de diferentes enfermedades. Para ello se estudió la aplicabilidad del método propuesto con dos fluoróforos diferentes: 5-IAF y BODIPY-IA. En tercer y último lugar, se estudió la posible derivatización fluorescente del PSA de forma covalente a través de sus grupos amino, utilizando para ello un reactivo colorante relativamente novedoso en la derivatización fluorescente de proteínas, Chromeo P503.

3.3.1. Derivatización no-covalente

Para evaluar la posibilidad de realizar el marcado fluorescente de PSA con NanoOrange se aplicó un procedimiento de derivatización pre-capilar. Se estudió en primer lugar el efecto de la emisión fluorescente del colorante en diferentes tampones en ausencia de glicoproteína. En la Figura 3.3 se muestran los espectros de fluorescencia con excitación a 488 nm del NanoOrange en concentración 2x en algunos de los BGE empleados en la separación de isoformas de PSA, presentados en el Capítulo 1 y en el BGE utilizado para la separación de isoformas de AGP, que contiene una elevada concentración de compuestos orgánicos.

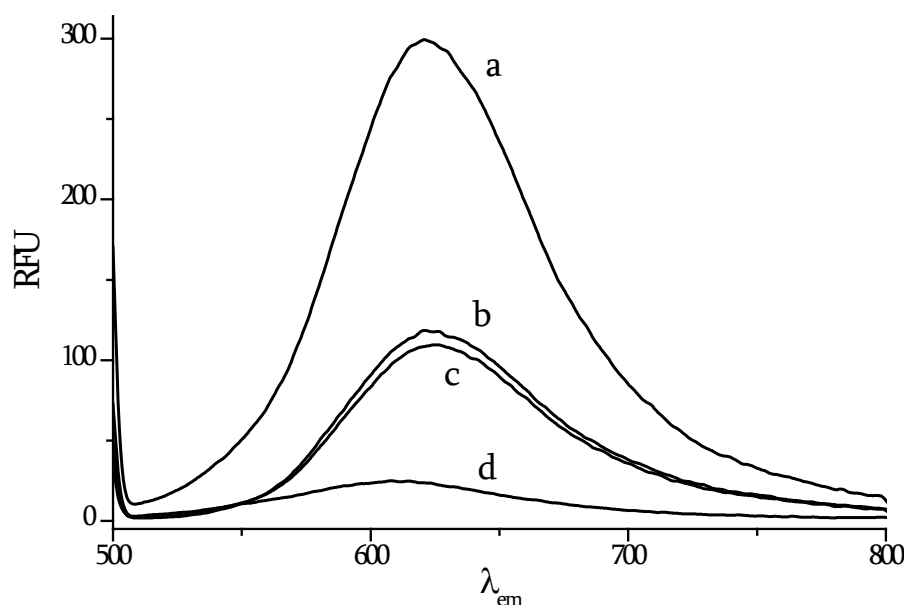


Figura 3.3. Espectro de emisión de fluorescencia, con excitación a 488 nm del colorante NanoOrange en concentración 2x en diferentes tampones: (a) tricina 10 mM, acetato sódico 10 mM, cloruro sódico 10 mM, urea 7 M y putrescina 4,5 mM a pH 4,5; (b) tetraborato sódico 5 mM, dihidrogenofosfato sódico 10 mM y morfolina 50 mM a pH 9,0; (c) tetraborato sódico 5 mM, dihidrogenofosfato sódico 10 mM y bromuro de decametonio 2 mM a pH 9,0; (d) tetraborato sódico 30 mM y dihidrogenofosfato sódico 10 mM a pH 9,0.

Como se observa en la figura, el NanoOrange presenta un máximo de emisión entre 610-620 nm y una intensidad notablemente diferente en los distintos tampones

empleados, indicando que probablemente el colorante se una a las sustancias presentes en el tampón, lo que resulta en una fluorescencia intensa cuando se emplea el BGE en el que se produce la separación de isoformas de AGP (Figura 3.3a). Los BGE que contienen morfolina y bromuro de decametonio (Figuras 3.3b y c), empleados para la separación de isoformas de PSA, presentan un máximo mucho menos intenso pero también superior al que experimenta el colorante en el BGE que no contiene estas sustancias (Figura 3.3d), las cuales podrían interaccionar con la molécula del NanoOrange. Por tanto, para la derivatización en-capilar del PSA con NanoOrange, el método más adecuado es el que emplea capilares recubiertos con UltraTrol LN y BGE consistente en tetraborato sódico 30 mM y dihidrogenofosfato sódico 10 mM a pH 9,0, que presenta la emisión fluorescente menos intensa en presencia del colorante.

Antes de iniciar los experimentos de derivatización no-covalente pre-capilar, se hicieron medidas de fluorescencia en un espectrofluorímetro. Para ello, a una disolución de 15 $\mu\text{g/ml}$ de PSA en tampón tetraborato sódico 30 mM y dihidrogenofosfato sódico 10 mM a pH 9,0 se añadió NanoOrange a concentración 1x. Como control de la derivatización, se aplicó el mismo procedimiento a una disolución de HSA en concentración 1 $\mu\text{g/ml}$, con objeto de tener una referencia de la emisión fluorescente del NanoOrange unido a esta proteína con la que se han descrito LODs al nivel nM [22]. En la Figura 3.4 se pueden observar los espectros de emisión fluorescente para los patrones de las proteínas marcadas con el colorante, junto con los obtenidos para los blancos en ausencia de proteínas. Como se puede ver, el NanoOrange experimenta un notable aumento en la emisión de fluorescencia cuando se encuentra en presencia de HSA. No ocurre así cuando se trata de PSA, para el que el aumento en la emisión fluorescente del NanoOrange resulta casi inapreciable, a pesar de que se encuentra en el medio al doble de concentración en comparación con la utilizada para la HSA.

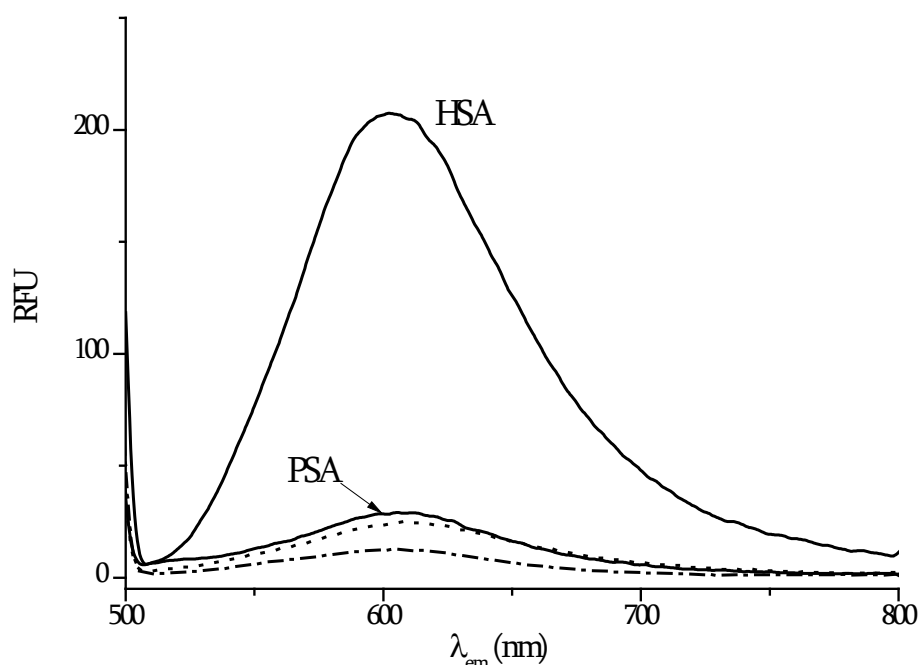


Figura 3.4. Espectros de emisión de fluorescencia, con excitación a 488 nm, de NanoOrange unido a HSA 1 $\mu\text{g/ml}$ en concentración 1x y a PSA 15 $\mu\text{g/ml}$ en concentración 2x y los blancos de derivatización correspondientes en ausencia de la proteína. Derivatización pre-capilar realizada a 37°C durante 30 min en tampón tetraborato sódico 30 mM y dihidrogenofosfato sódico 10 mM a pH 9,0 y (—•—) NanoOrange 1x y (•••) NanoOrange 2x.

Aunque la relación de moles de colorante frente a moles de proteína es mayor para el caso de la HSA, esto no debería ser el origen del problema de sensibilidad ya que, según el fabricante, una misma concentración de NanoOrange de 1x se utiliza para cuantificar HSA en un intervalo de concentración que puede ir de 0,1 hasta 10 $\mu\text{g/ml}$. Además, 1x es la concentración de NanoOrange empleada para la derivatización de otras proteínas como lisozima, Rib A, mioglobina, BSA o Tf a concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ [23, 48].

Posteriormente los patrones de HSA y PSA marcados con NanoOrange, empleando el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior para los experimentos en el espectrofluorímetro, se analizaron en el sistema de CE-LIF, añadiendo además el colorante en el BGE en concentraciones 1x y 2x, respectivamente. Empleando un capilar recubierto con UltraTrol, las proteínas

derivatizadas se movilizaron desde el punto de inyección al de detección con ayuda de una presión de 50 mbar. El resultado se puede observar en la Figura 3.5.

Nuevamente, la HSA marcada con NanoOrange muestra una intensa banda de emisión fluorescente, en este caso detectada por el sistema de CE-LIF. En el caso del PSA, sin embargo, el detector de CE-LIF no tiene sensibilidad suficiente para detectar el aumento de fluorescencia del NanoOrange unido a esta glicoproteína, que se ha observado previamente en el espectrofluorímetro.

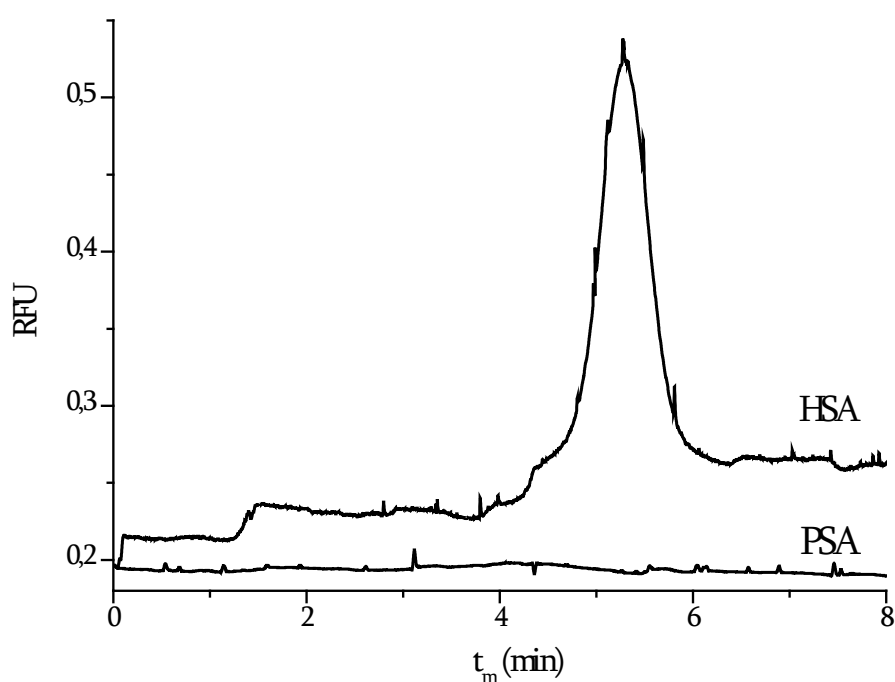


Figura 3.5. Análisis por CE-LIF de NanoOrange unido a HSA 1 $\mu\text{g/ml}$ en concentración 1x y a PSA 15 $\mu\text{g/ml}$ en concentración 2x. Condiciones de derivatización como en la Figura 3.4. BGE: tampón tetraborato sódico 30 mM, dihidrogenofosfato sódico 10 mM, pH 9,0 y NanoOrange, 1x para HSA y 2x para PSA. Inyección a 35 mbar durante 30 s y posterior movilización a 50 mbar. Excitación a 488 nm y tensión de polarización del PMT a 700 V.

Posteriormente, el PSA en concentración 15 $\mu\text{g/ml}$ y sin ningún tratamiento previo se inyectó en el sistema de CE-LIF y trató de derivatizarse en-capilar con NanoOrange, presente en el BGE en dos concentraciones diferentes, 1x y 2x, mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.2.4.3. Un procedimiento similar,

aplicado con anterioridad por otros autores para el análisis de Tf mediante derivatización en-capilar con NanoOrange, demostró un buen LOD para esta glicoproteína por CE-LIF, debido presumiblemente al aumento de temperatura que se produce en la región del *plug* de inyección cuando se aplica el campo eléctrico [48]. Sin embargo, no se detectaron picos de PSA marcado con NanoOrange en estas condiciones.

A la vista de estos resultados, el marcado fluorescente de PSA con NanoOrange a concentraciones por debajo del nivel de concentración μM , para el análisis de sus isoformas por CE-LIF, no parece viable. El método de derivatización fluorescente con NanoOrange parece tener gran variabilidad entre proteínas, como se ha descrito en la bibliografía. El hecho de que aparezca como un método muy sensible para la detección de proteínas séricas como la BSA o la HSA, puede estar relacionado con la naturaleza transportadora de estas proteínas, que presenten probablemente una gran cantidad de regiones hidrófobas en su estructura favoreciendo la unión del colorante.

3.3.2. Derivatización covalente

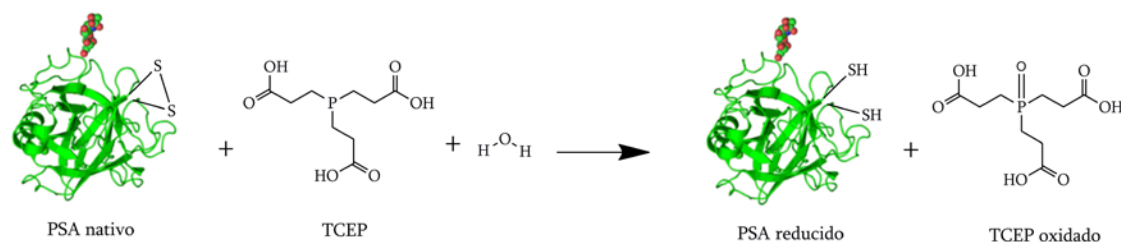
3.3.2.1. Reacción a través de grupos tiol

Los colorantes utilizados en este experimento, 5-IAF y BODIPY-IA, presentan una banda de absorción de luz compatible con la fuente de excitación disponible en el laboratorio, un láser emitiendo a 488 nm. El derivado de fluoresceína presenta máximos de absorción y emisión centrados a 491 y 518 nm, respectivamente, mientras que el derivado de BODIPY presenta esos mismos máximos centrados a 502 y 512 nm.

Los grupos tiol en proteínas se encuentran formando parte de los residuos de cisteína, que normalmente no se encuentran libres, sino formando puentes disulfuro. Para la derivatización de los grupos tiol fue necesaria por tanto, la reducción de los

puentes disulfuro presentes en las glicoproteínas estudiadas. Para ello, se empleó TCEP (Figura 3.6), un agente reductor estable en disolución acuosa, muy efectivo y selectivo frente a otros grupos funcionales [49]. Además, la TCEP no es reactiva, en principio, con la iodoacetamida, por lo que no es necesario eliminarla de la mezcla de reacción previamente al marcado fluorescente. Sin embargo, existen algunos trabajos que afirman que la TCEP reacciona con algunos haluros de acilo electrófilos [50], por lo que en nuestro caso solo se añadió en un exceso de 2 frente a los grupos tiol presentes en cada una de las dos glicoproteínas estudiadas.

1.Reducción de puentes disulfuro



2.Marcado fluorescente con 5-IAF

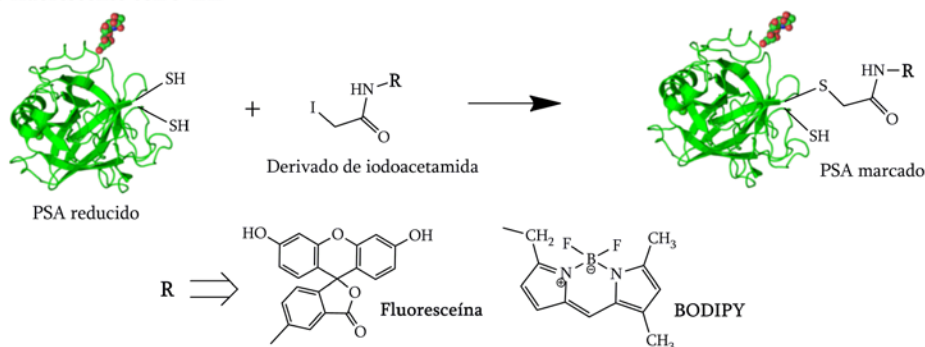


Figura 3.6. Derivatización de proteínas a través de los grupos tiol. Esquema de la reacción en dos pasos seguida para el marcado fluorescente de las glicoproteínas estudiadas en este trabajo. En este caso, se ilustra con el PSA.

3.3.2.1.1. Marcado con 5-IAF

Como ya se ha comentado, la glicoproteína sérica humana AGP fue utilizada como proteína modelo para el marcado fluorescente a través de los grupos tiol. La AGP es una glicoproteína de 41-43 kDa, con valores de pI en el intervalo 2,8-3,8 [43]. Su elevado contenido en carbohidratos, por un lado, y la presencia de variantes genéticas en la cadena polipeptídica, por otro, hacen que se hayan descrito más de 150 isoformas de esta glicoproteína, detectadas por técnicas de CE-MS [51]. La presencia de 4 residuos de cisteína formando dos puentes disulfuro, y la elevada heterogeneidad que presenta la AGP hacen de esta glicoproteína un modelo adecuado para la aplicación del procedimiento de derivatización fluorescente a través de los grupos tiol y su posterior análisis por CE-LIF. Además, existen antecedentes en nuestro laboratorio que ponen de manifiesto el interés de la AGP como potencial biomarcador de diversas enfermedades [44, 47].

En la Figura 3.7, se puede observar el perfil de isoformas obtenido en el presente trabajo por CZE con detección UV para un patrón de AGP, mediante un método desarrollado en el laboratorio de realización de esta Tesis [47], con una modificación en la longitud efectiva del capilar. Como se puede observar, se obtiene la separación de 11 isoformas de AGP patrón en una longitud efectiva de 51 cm, cuando esta longitud correspondía a 70 cm en el método original. Como es lógico, la resolución se vio ligeramente afectada con la reducción en este parámetro de separación.

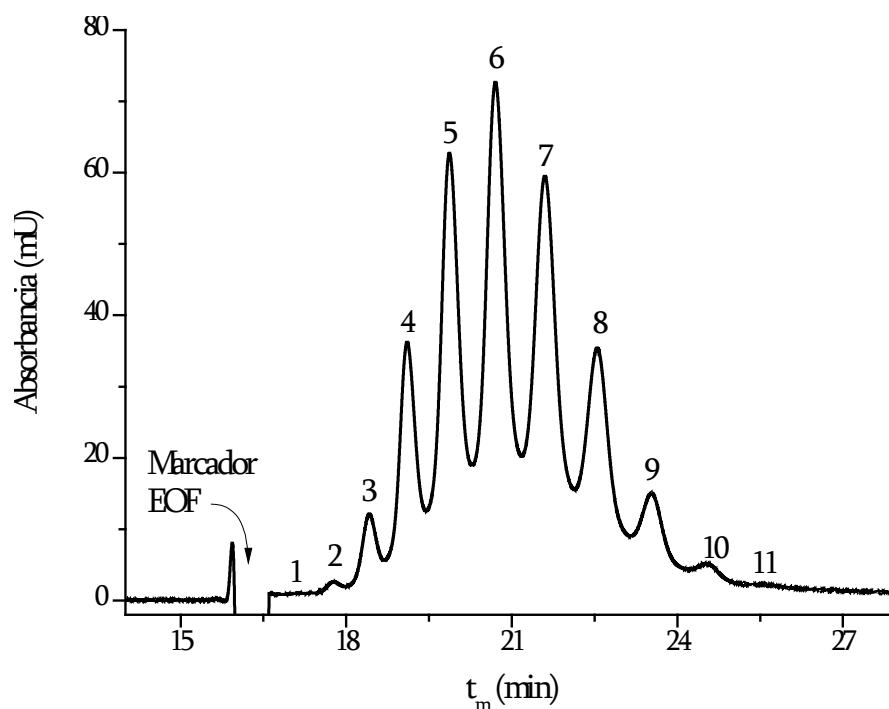


Figura 3.7. Perfil electroforético de isoformas de AGP 5,6 mg/ml obtenido por CE-UV. BGE: tricina 10 mM, acetato sódico 10 mM, cloruro sódico 10 mM, urea 7 M y putrescina 4,5 mM a pH 4,5. Otras condiciones de separación: $l = 51$ cm, 35°C y 357 V/cm con detección a 214 nm. Inyección hidrodinámica a 35 mbar durante 25 s.

A continuación, se muestra el análisis por CE-LIF del mismo patrón de AGP con una concentración de $11\text{ }\mu\text{g/ml}$, obtenido por dilución del patrón de AGP $16,7\text{ mg/ml}$ después de su derivatización covalente con aproximadamente 30 excesos, respecto a los grupos tiol presentes en la glicoproteína, del fluoróforo 5-IAF (Figura 3.8). En el electroforegrama se pudo observar la separación del mismo número de isoformas, poniendo de manifiesto la derivatización fluorescente satisfactoria. Por otro lado, se puede observar una disminución en la resolución de las isoformas, que podría estar asociada al hecho de que ambos análisis fueron realizados en diferentes capilares, con diferente EOF; de hecho, son evidentes los t_m menores obtenidos para la AGP derivatizada, así como el menor t_m obtenido para el marcador del EOF. En este sentido, un aumento en la velocidad del EOF, con la consecuente reducción de los t_m , podría ser una posible causa de la pérdida de resolución que se observa para las

isoformas de la AGP derivatizada con 5-IAF respecto a la AGP sin derivatizar. Sin embargo, también debe considerarse como posible causa de la pérdida de resolución, el cambio en el radio hidrodinámico que pueden sufrir las diferentes isoformas de AGP tras la derivatización. El posible cambio en el radio hidrodinámico afecta directamente a la μ_{ap} y al coeficiente de difusión de las distintas isoformas de AGP, dos términos que afectan a la Rs entre dos picos electroforéticos como se puede comprobar en la Ec. 1.3 (Capítulo 1).

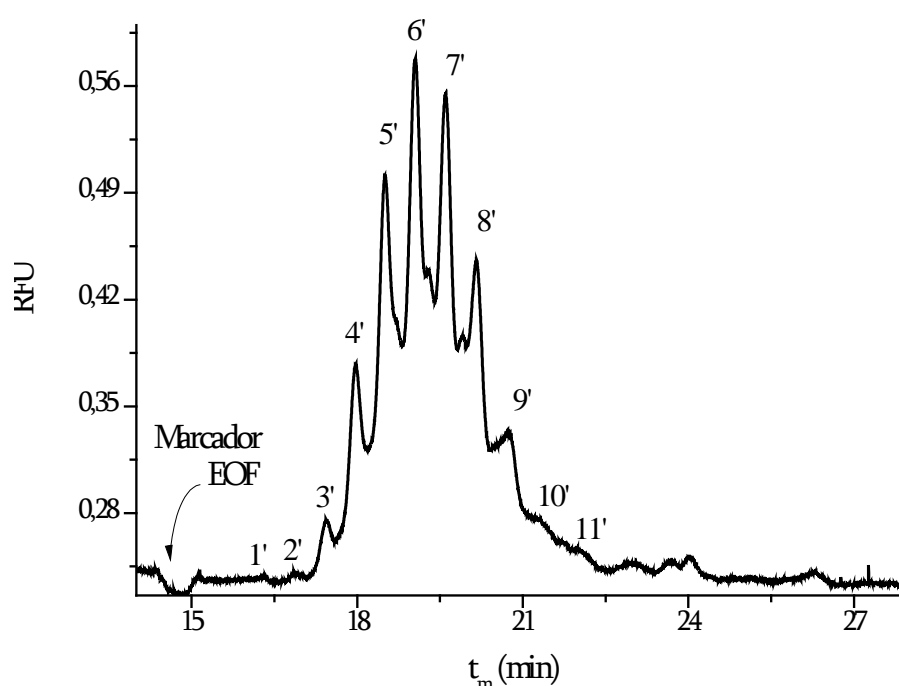


Figura 3.8. Perfil de isoformas de AGP 11 $\mu\text{g/ml}$ derivatizada con 5-IAF, obtenido por CE-LIF. Inyección hidrodinámica a 35 mbar durante 30 s. Excitación a 488 nm y tensión de polarización del PMT a 700 V. BGE y otras condiciones electroforéticas como en la Figura 3.7.

Por otro lado, no puede descartarse que se produzca un cambio en la μ_{ef} de las isoformas derivatizadas de AGP, debido a la posible introducción en la glicoproteína de carga negativa procedente del fluoróforo, ya que la molécula de fluoresceína puede desprotonarse hasta en tres restos dependiendo del pH en que se encuentra (Figura 3.9) [52]. En efecto, tal como se muestra en la Figura 3.9, al pH de la

separación (pH 4,5), pueden coexistir especies neutras y monocargadas de la fluoresceína, lo que podría alterar ligeramente el pI de las isoformas de AGP.

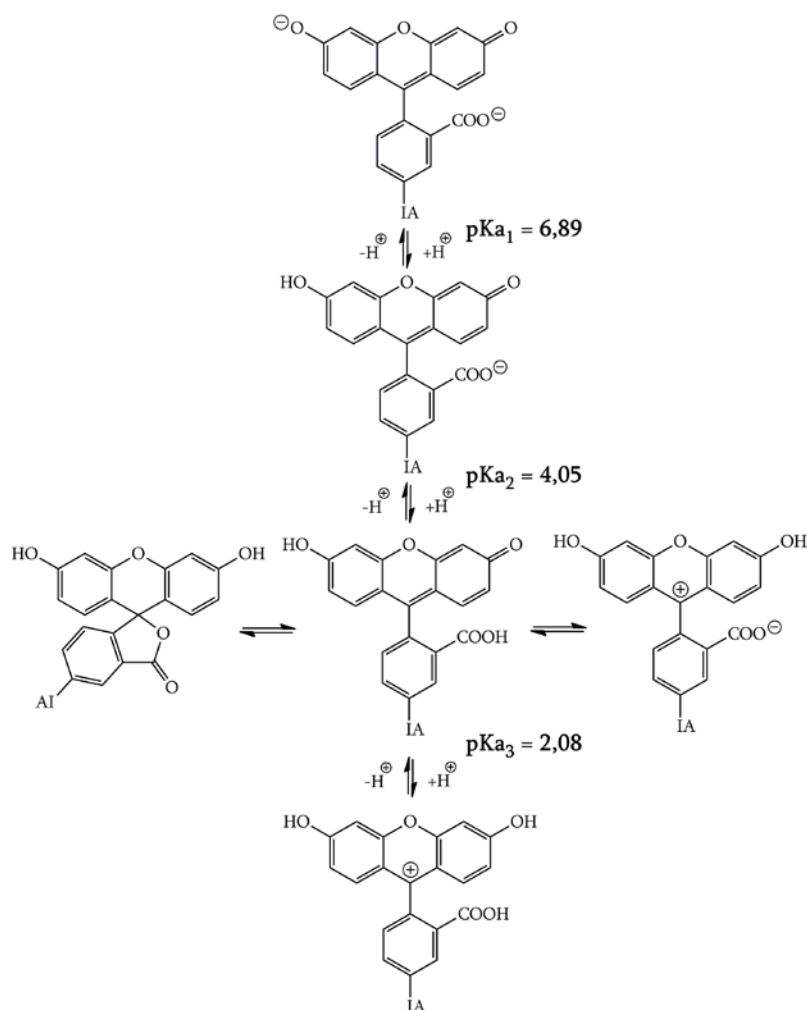


Figura 3.9. Equilibrios de desprotonación de la molécula 5-IAF en medio acuoso y las estructuras resultantes en función del pH [52].

Otro fenómeno observado en el análisis de la AGP marcada con 5-IAF fue la aparición de desdoblamiento en forma de pequeños picos, entre las isoformas 6' y 8' (ver Figura 3.8). El origen de estos pequeños picos no está del todo claro, pero también se observa en determinadas ocasiones cuando se realiza el análisis por CE-UV de la AGP nativa y se ha llegado a atribuir a un cierto envejecimiento de la glicoproteína en las muestras, tanto en el patrón como en la obtenida de muestras biológicas purificadas en el laboratorio. De todos modos, tampoco se descarta que la

aparición de esos pequeños desdoblamientos se deba al proceso de derivatización, bien por una ligera desnaturalización de la AGP o bien por el efecto de subproductos de reacción.

A continuación se procedió a estimar el LOD alcanzado con la detección por LIF de la AGP marcada con 5-IAF, derivatizada al nivel de mg/ml de glicoproteína. Para ello, se analizó por CE-LIF una alícuota con una concentración de 0,1 µg/ml en AGP, obtenida por dilución de la AGP derivatizada con 5-IAF. Paralelamente, se analizó por CE-UV otra alícuota de AGP, en este caso sin derivatizar, con una concentración de la glicoproteína de 0,11 mg/ml. El LOD ($S/N=3$) estimado fue 12 µg/ml para la detección UV de AGP nativa y 80 ng/ml para la detección LIF de AGP derivatizada con 5-IAF. Es decir, en estas condiciones de derivatización la detección LIF es superior a dos órdenes de magnitud más sensible que la detección UV. En este punto, cabe decir que el LOD estimado para la detección de AGP derivatizada corresponde con un LOD instrumental y no un LOD del método de derivatización, lo cual se discutirá en el siguiente apartado.

El mismo método fue aplicado a la derivatización fluorescente de PSA con 5-IAF. Sin embargo, los resultados para esta glicoproteína no resultaron similares a los obtenidos para la AGP. En la Figura 3.10 se muestran los análisis por CE-LIF del PSA derivatizado con 5-IAF, con una concentración de 0,33 mg/ml de la glicoproteína tras la derivatización y purificación en Microcon, y el correspondiente blanco de reacción (mismo proceso de derivatización realizado sobre una disolución que no contiene PSA), poniendo de manifiesto que el marcado fluorescente de la glicoproteína ha tenido lugar.

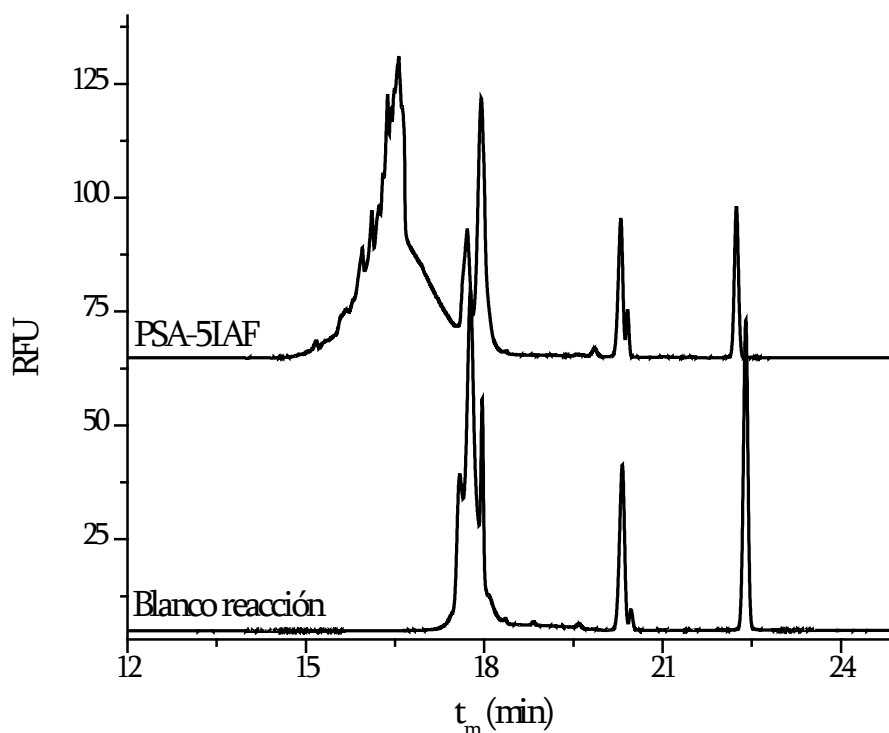


Figura 3.10. Análisis por CE-LIF de PSA 0,33 mg/ml derivatizado con 5-IAF y el correspondiente blanco de reacción. BGE: tetraborato sódico 5 mM, dihidrogenofosfato sódico 10 mM y bromuro de decametonio 2 mM a pH 9,0. Otras condiciones electroforéticas: $l = 51$ cm, 35°C y 357 V/cm. Inyección hidrodinámica a 35 mbar durante 30 s. Excitación a 488 nm y tensión de polarización del PMT a 700 V.

Sin embargo, como se puede observar, no se produce la separación de isoformas de PSA previamente obtenida para la proteína sin derivatizar. La presencia de los picos que aparecen también en el análisis del blanco de reacción, indica la limpieza insuficiente que se realizó sobre la mezcla de reacción. Estos picos observados en el blanco de reacción y que aparecen también en la muestra, aunque haya sido purificada en el dispositivo de ultrafiltración para eliminar los compuestos de bajo peso molecular, corresponden probablemente al exceso de colorante y probablemente también a otros subproductos de reacción con el DTT o incluso con la TCEP.

En la Figura 3.11, se muestra el análisis por CE-UV del mismo PSA derivatizado con 5-IAF comparado con el análisis realizado para el PSA patrón. En

ella se puede observar que se obtiene la separación de isoformas para el PSA no derivatizado, mientras que para el PSA marcado con 5-IAF se obtiene la detección de un solo pico ensanchado. Además, el pico ensanchado aparece a un t_m retrasado con respecto al obtenido en el análisis por CE-LIF (Figura 3.10). La razón de la pérdida de resolución, así como el retraso en el t_m , se atribuyó a la naturaleza de la molécula de 5-IAF. Como se puede ver en la Figura 3.9, la molécula de fluoróforo presenta hasta dos cargas negativas al pH de la separación de isoformas de PSA, pH 9,0, a diferencia del pH ácido a 4,5 en el que se realiza la separación de isoformas de AGP. La presencia de cargas negativas adicionales en la estructura del PSA podría acarrear un cambio importante de pI, ya que esta glicoproteína contiene 5 puentes disulfuro con un total de diez residuos de cisteína susceptibles de reaccionar con el fluoróforo. El cambio en el pI de las distintas moléculas de PSA degradaría la separación, mientras que la adición de cargas negativas disminuiría la μ_{ap} de las distintas isoformas.

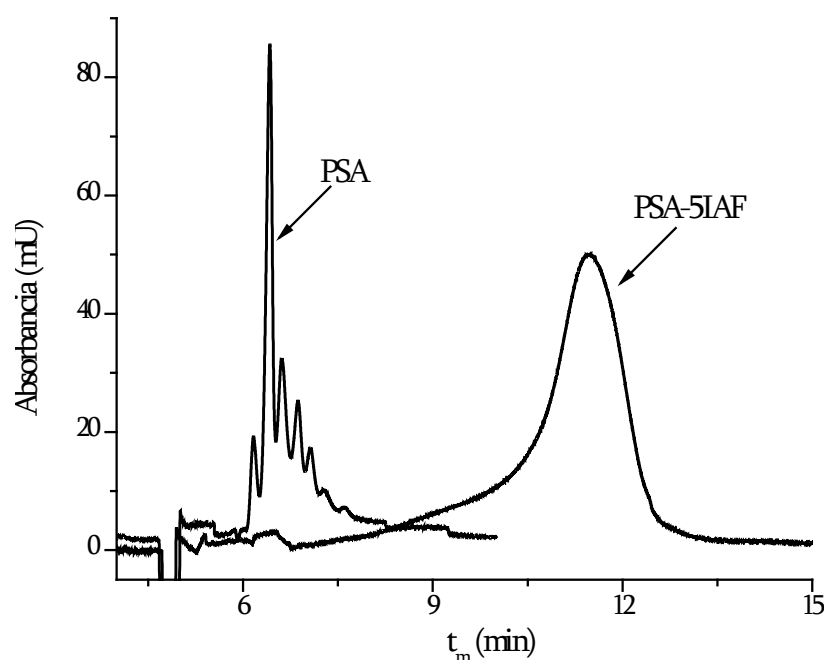


Figura 3.11. Análisis por CE-UV de PSA 1 mg/ml y PSA 0,33 mg/ml derivatizado con 5-IAF. BGE: tetraborato sódico 5 mM, dihidrogenofosfato sódico 10 mM y bromuro de decametONIO 2 mM a pH 9,0. Otras condiciones electroforéticas: $l = 51$ cm, 35°C y 420 V/cm con detección a 214 nm. Inyección hidrodinámica a 35 mbar durante 30 s.

3.3.2.1.1.1. Derivatización fluorescente de AGP en muestras biológicas

Vista la posibilidad de derivatización fluorescente de AGP compatible con la separación de sus isoformas en su análisis por CE-LIF, se aplicó el método a la AGP contenida en dos muestras biológicas: un suero control, procedente de un individuo sano y un secretoma con interés clínico, procedente de una sección de arteria de un paciente con aneurisma aórtico abdominal. La AGP de estas muestras fue purificada por IAC, utilizando el método desarrollado en el laboratorio donde se ha realizado este trabajo de Tesis [43, 44]. La concentración de AGP en ambas muestras purificadas y llevadas a un volumen de 5 μ l, se estimó por interpolación en las áreas de pico obtenidas para AGP patrón mediante el análisis por CE-UV, correspondiendo a 8,6 mg/ml en suero y 0,3 mg/ml en secretoma.

La derivatización con 5-IAF de la AGP procedente del suero produjo un perfil electroforético obtenido por CE-LIF muy similar al que se obtuvo para el patrón de AGP derivatizado del mismo modo. Se puede observar en la Figura 3.12 la separación de 11 isoformas, el mismo número y con t_m similares a las que se observaron para el patrón de AGP derivatizado con 5-IAF (ver Figura 3.8). También se pueden apreciar los desdoblamientos en forma de pequeños picos, aparecidos entre las isoformas 5' y 9' que ya se habían observado en el análisis por CE-LIF del patrón derivatizado. En cuanto a sensibilidad, en el caso de la AGP procedente del suero se obtuvo una mejora de al menos dos órdenes de magnitud respecto a la detección por CE-UV de la misma AGP sin derivatizar, al igual que ocurre con el patrón. Por otro lado, se puede observar también una significativa mejora en cuanto a la resolución, si se compara la separación de isoformas de AGP derivatizada procedente del suero con el correspondiente patrón (Figura 3.8). Este hecho también se observa en los respectivos análisis por CE-UV de ambas muestras (datos no mostrados) y puede deberse a un mayor grado de purificación que presente la AGP extraída del suero en el laboratorio, mediante el procedimiento de IAC.

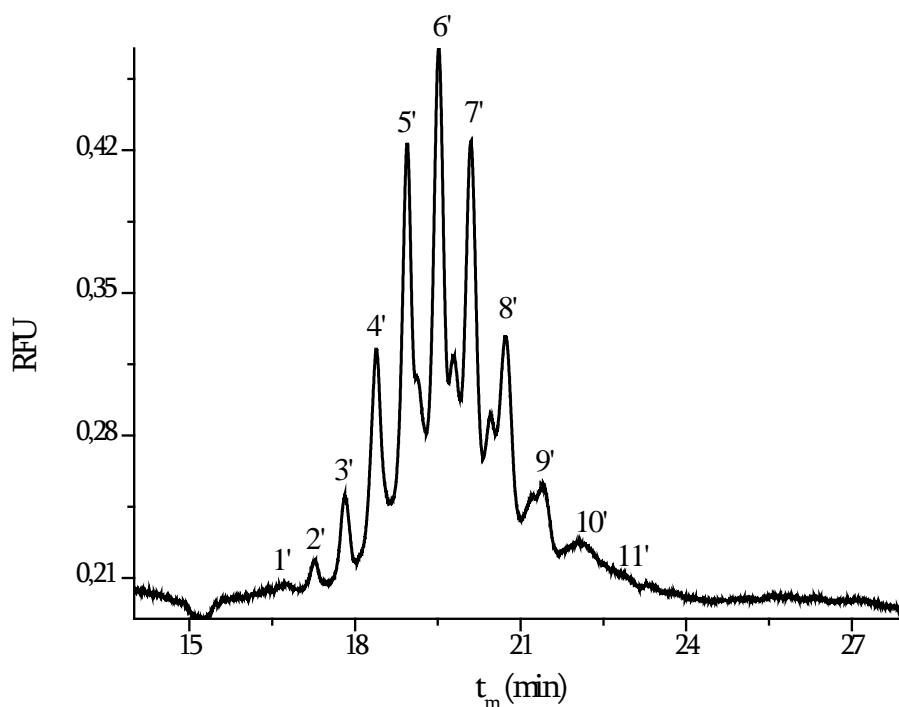


Figura 3.12. Análisis por CE-LIF de AGP purificada a partir de un suero humano por IAC y derivatizada con 5-IAF. Condiciones de análisis como en la Figura 3.8.

A continuación, el mismo método de derivatización se aplicó a la AGP procedente de secretoma. Debido al menor nivel de concentración de la glicoproteína presente en esta muestra que en el suero (unas 30 veces menor) el proceso de marcado fluorescente se realizó simultáneamente, como control, sobre una disolución de AGP estándar de concentración 0,3 mg/ml, equivalente a la estimada en la muestra purificada de secretoma. En este punto cabe destacar la diferencia entre sensibilidad instrumental y sensibilidad del método, aspecto a tener en cuenta cuando se aplica la derivatización fluorescente a muestras con una baja concentración de proteínas, como ocurre en la mayoría de casos clínicos de interés. En este sentido, el LOD del método se refiere a la mínima cantidad de proteína en la muestra que puede ser detectada, teniendo en cuenta todo el proceso analítico, es decir, derivatización fluorescente, separación y detección.

El análisis por CE-LIF del estándar de AGP derivatizado a una concentración de 0,3 mg/ml, reveló que el LOD del método con detección LIF era muy similar al

que se obtenía con detección UV para el estándar sin derivatizar. Este hecho pone de manifiesto el impedimento que supone la aplicación de métodos de derivatización fluorescente sobre disoluciones muy diluidas de proteínas, con las que se alcanza en la mayoría de los casos un rendimiento muy bajo de reacción de derivatización [29, 53]. También hay que tener en cuenta que en el caso de la AGP, únicamente 4 residuos de cisteína pueden ser derivatizados y es posible que no todos ellos se encuentren suficientemente accesibles para, primero, ser liberados del puente disulfuro y, después, reaccionar con el colorante.

La Figura 3.13 muestra los análisis por CE-UV y CE-LIF de la AGP procedente del secretoma sin derivatizar y marcado con 5-IAF, respectivamente. Se puede observar una resolución muy semejante para las isoformas en ambas separaciones, indicando que el proceso de derivatización no ha modificado las propiedades electroforéticas de éstas.

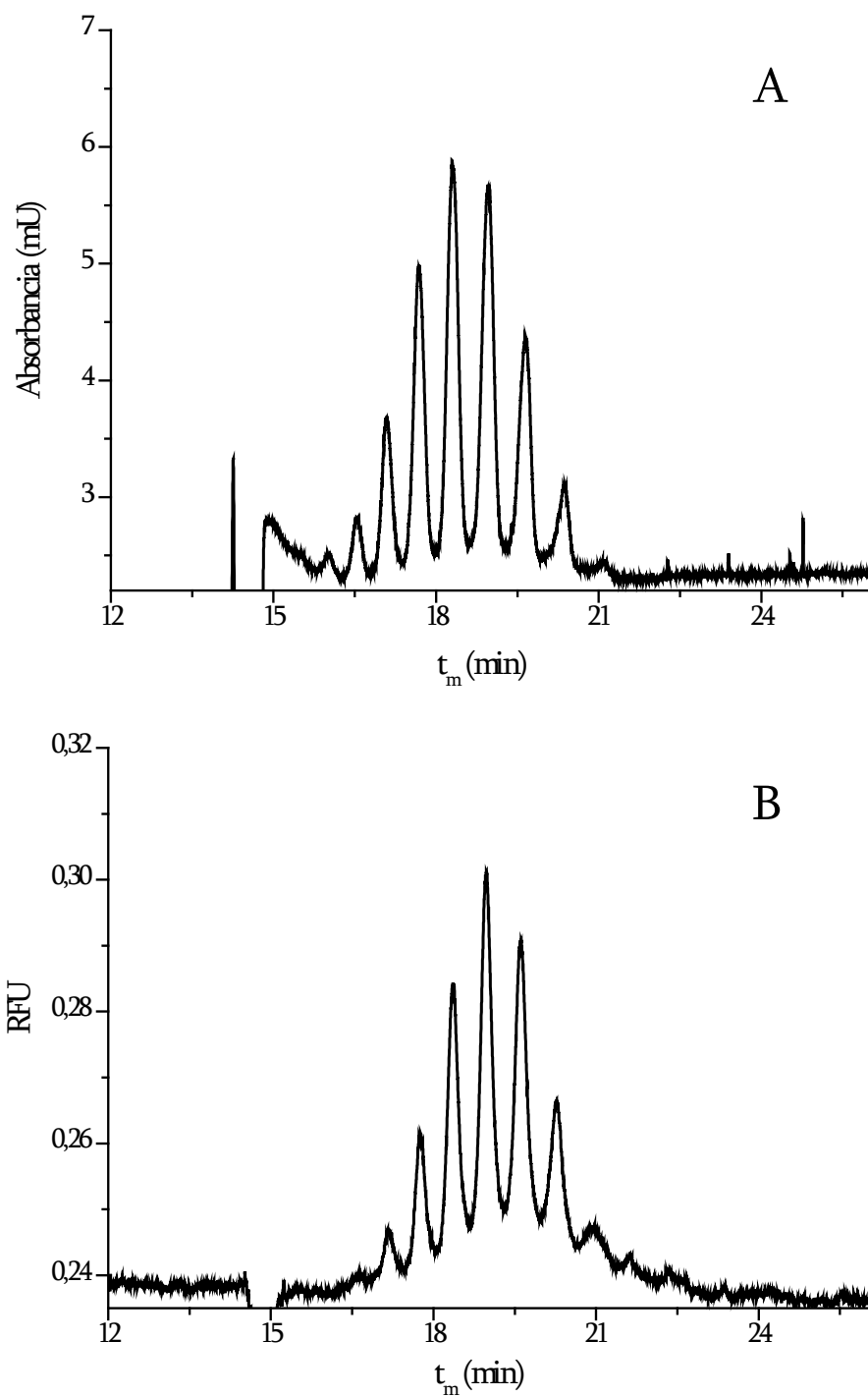


Figura 3.13. Análisis de AGP purificada de secretoma por IAC, (A) por CE-UV y (B) por CE-LIF en la parte inferior. Condiciones de análisis como en la Figura 3.7 para CE-UV y como en la Figura 3.8 para CE-LIF.

3.3.2.1.2. Marcado con BODIPY-IA

El BODIPY es un fluoróforo con un elevado rendimiento cuántico, no presenta carga en ningún intervalo de pH y su emisión fluorescente es independiente del pH del BGE. Dada su imposibilidad de ionización, se eligió el derivado de iodoacetamida de este fluoróforo para tratar de derivatizar el PSA para el análisis de sus isoformas por CE-LIF, en sustitución de la 5-IAF que, como se ha discutido, añade carga a la molécula de glicoproteína al pH de la separación.

Antes de derivatizar PSA, el proceso de funcionalización con BODIPY-IA a través de los grupos tiol se aplicó como modelo al marcado fluorescente de la AGP, con diferentes excesos del colorante de 5, 10 y 30 respecto a los grupos tiol de la glicoproteína. Sorprendentemente, los resultados fueron muy similares para cada uno de los excesos de colorante añadidos, en cuanto a resolución y sensibilidad. En cualquier caso, la eliminación del exceso de colorante fue una tarea tediosa debido a la baja solubilidad que presenta el BODIPY en soluciones acuosas, requiriéndose una exhaustiva limpieza con etanol al 70%, ya que de otro modo, el exceso de este reactivo disminuía la resolución de la separación de la AGP en sus isoformas. El análisis por CE-LIF del patrón de AGP 5,6 µg/ml, obtenido por dilución del patrón de AGP 16,7 mg/ml derivatizado con BODIPY-IA, se muestra en la Figura 3.14. En ella se puede observar la separación de al menos 8 isoformas de AGP derivatizada, a diferencia de las 11 que se detectaron con la derivatización con 5-IAF de la misma glicoproteína (ver Figura 3.8). También se puede apreciar, comparando la derivatización con ambos colorantes, que la resolución es bastante menor en el caso del marcado con BODIPY, relacionado probablemente con la disminución en el t_m que sufren las isoformas detectadas, empleando este último colorante. La pérdida de resolución en CE para la separación de isoformas de una glicoproteína, puede estar promovida por cambios en su estructura o en su relación carga/tamaño que se puedan generar tras la derivatización fluorescente. En este caso, la masa añadida correspondiente a aproximadamente 290 g/mol del derivado de BODIPY, comparado

con la masa de la AGP, no debería causar ningún cambio significativo. Un cambio en el pI de la AGP tampoco parece ser la razón de la pérdida de resolución tras la derivatización con BODIPY-IA, pues la molécula de colorante es neutra. En comparación con la derivatización con 5-IAF, el aporte en este caso de una ligera densidad de carga negativa quizá contrarreste el aporte de masa procedente del colorante, proporcionando unos t_m ligeramente mayores que en el caso del BODIPY-IA y finalmente mejor resolución.

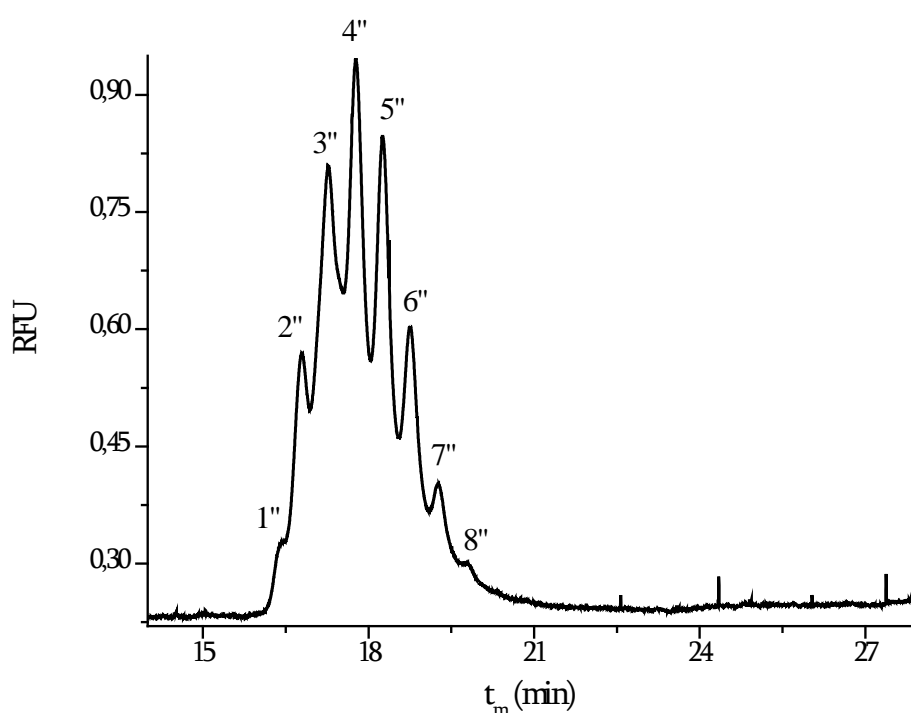


Figura 3.14. Perfil de isoformas de AGP 5,6 µg/ml obtenido por CE-LIF tras su derivatización con BODIPY-IA. BGE y condiciones de separación como en la Figura 3.8.

Por otro lado, y como cabía esperar, la sensibilidad obtenida con la derivatización con BODIPY-IA fue superior a la obtenida con 5-IAF, debido a la dependencia de la emisión fluorescente de la fluoresceína con el pH, siendo inferior a pH ácido [52]. El LOD instrumental alcanzado para la derivatización de AGP con BODIPY, estimado de la misma forma en que se detalló en la sección anterior, fue de 16 ng/ml, cinco veces inferior al obtenido para el colorante 5-IAF y unos 3 órdenes

de magnitud inferior al obtenido para el análisis por CE-UV de la glicoproteína sin derivatizar.

A continuación, la derivatización fluorescente con BODIPY-IA se aplicó al PSA. La reacción se llevó a cabo con diferentes concentraciones del colorante para obtener 5, 10, 20 y 30 excesos del reactivo BODIPY-IA respecto a los grupos tiol del PSA liberados de la reducción de los puentes disulfuro. En la Figura 3.15 se muestra un análisis por CE-LIF del patrón de PSA 3,7 $\mu\text{g/ml}$, obtenido por dilución del patrón de PSA 1 mg/ml derivatizado con BODIPY-IA, junto con un blanco de reacción, consistente en el mismo proceso de derivatización en ausencia de PSA.

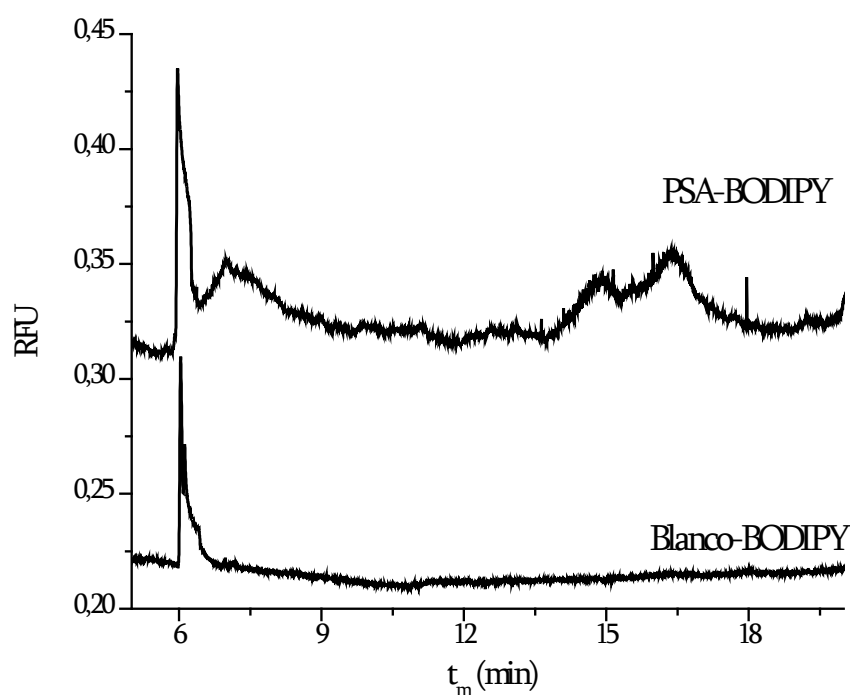


Figura 3.15. Análisis por CE-LIF de PSA 3,7 $\mu\text{g/ml}$ tras su derivatización con BODIPY-IA y de la disolución de blanco de reacción. Condiciones electroforéticas como en la Figura 3.10.

Del mismo modo que para la derivatización de la AGP con este colorante, la sensibilidad obtenida para la derivatización del PSA fue muy similar, independientemente de los excesos de fluoróforo añadidos a la mezcla de reacción. Por otro lado, como ocurría con 5-IAF, tampoco se consiguió separación de

isoformas de PSA con la derivatización con BODIPY-IA, a pesar de que este colorante no añade carga a la molécula de glicoproteína, con ninguno de los diferentes excesos del colorante empleados en la reacción.

Como se puede observar, se detectan dos picos ensanchados debidos al PSA marcado fluorescentemente con BODIPY-IA, uno justo después del marcador del EOF (≈ 6 min) y otro desdoblado y más alejado de éste. El pico marcador del EOF corresponde al exceso de reactivo colorante, puesto que éste carece de carga eléctrica. La aparición de un pico ensanchado de PSA muy alejado del EOF podría indicar la presencia de carga negativa adicional en la molécula de glicoproteína, que no es posible que provenga de la molécula de colorante. Además, posteriormente se comprobó que un efecto similar se produce cuando el PSA se pone en contacto únicamente con la TCEP para disociar los puentes disulfuro, como se puede observar en la Figura 3.16 para un patrón de PSA en una concentración de 0,25 mg/ml en la mezcla de reacción con TCEP.

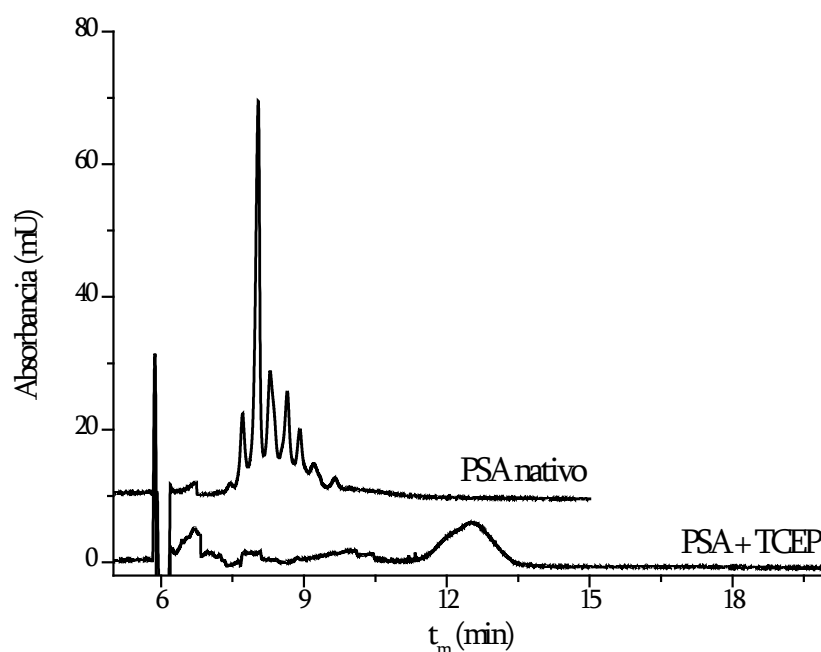


Figura 3.16. Análisis por CE-UV de PSA patrón 1 mg/ml y PSA patrón 0,25 mg/ml tras la reducción de sus puentes disulfuro con TCEP. BGE y condiciones de separación como en la Figura 3.10, salvo inyección hidrodinámica a 35 mbar durante 25 s.

Por esta razón se pensó que la pérdida de resolución podría deberse a la ionización de los nuevos grupos liberados en la molécula de PSA tras la reacción de reducción de los puentes disulfuro, los tioles, que no llegaron a reaccionar con el BODIPY-IA. El pK_a de estos grupos en aminoácidos libres está en torno a 8,3 y la separación de isoformas de PSA se realiza a pH 9,0. A continuación se llevó a cabo la separación a pH 8,0. A este pH, aún por encima del pI de la glicoproteína, la ionización de los grupos tiol quizá sea lo suficientemente baja para poder observar diferencias en la migración de las distintas isoformas del PSA derivatizado. Se comprobó de este modo que la pérdida de resolución tampoco se debía a la desprotonación de los grupos tiol en la glicoproteína, ya que a este último pH se obtiene el mismo pico ensanchado de PSA (Figura 3.17) que a pH 9,0. Como se puede ver, las isoformas del PSA nativo o sin derivatizar aparecen con una resolución muy alterada a este pH, si se compara con la obtenida a pH 9,0 en la figura anterior, aunque aún se observa separación y los picos aparecen próximos al marcador del EOF. Sin embargo, el patrón de PSA derivatizado con BODIPY-IA (con una concentración de la glicoproteína de 0,33 mg/ml tras la derivatización y purificación en Microcon) no muestra indicios de resolución alguna de isoformas a pH 8,0 y el pico ensanchado, aunque a un tiempo menor que a pH 9,0, aun aparece muy retrasado con respecto al marcador del EOF. La detección a 502 nm (Figura 3.17c), longitud de onda en el máximo de absorción del BODIPY-IA, demuestra que el pico ensanchado corresponde a PSA derivatizado.

Todo parece indicar que la pérdida de resolución de las isoformas de PSA tras su derivatización covalente a través de los grupos tiol, resulta del propio proceso de reducción de los puentes disulfuro. Es probable que la disociación de estos puentes modifique en gran medida la estructura tridimensional de la glicoproteína, ya que el PSA cuenta con 5 de estos enlaces que están implicados en la preservación de la estructura terciaria de las proteínas. Aun cuando las fosfinas, como la TCEP, no son tan eficientes reductores como puede serlo el DTT, existen antecedentes que indican

pérdida de actividad proteolítica del PSA en presencia de la TCEP [54], con lo que, el efecto de este reductor sobre la estructura de la glicoproteína parece ser suficiente para provocar un importante cambio en su estructura tridimensional, que podría modificar su radio hidrodinámico y en consecuencia la μ_{ap} de todas sus isoformas.

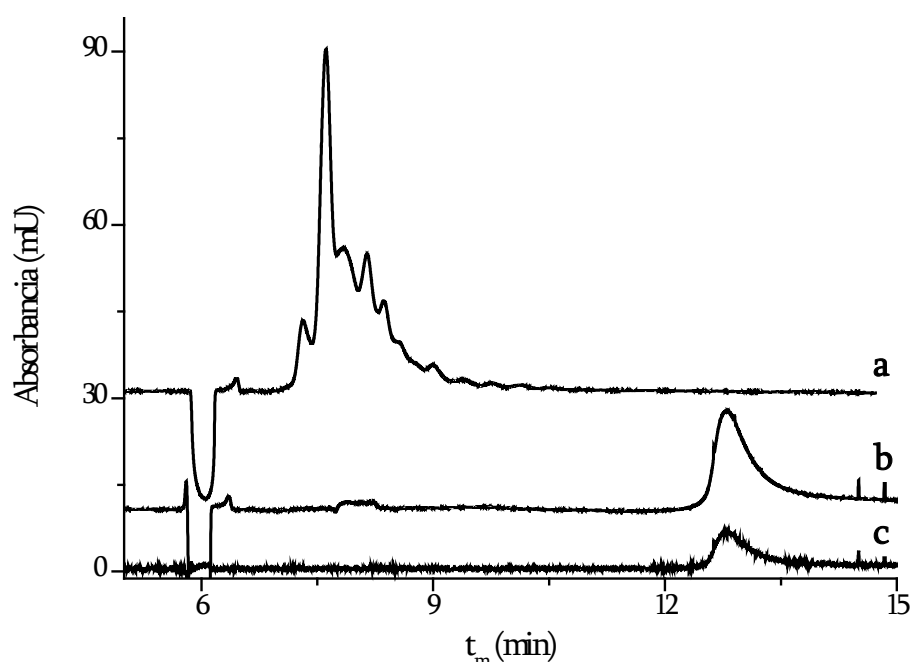


Figura 3.17. Análisis por CE-UV de PSA nativo 1 mg/ml (a) y PSA 0,33 mg/ml tras su derivatización con BODIPY-IA detectado a 214 nm (b) y 502 nm (c). BGE y condiciones de separación como en la Figura 3.16, salvo pH del BGE 8,0.

3.3.2.2. Reacción a través de grupos amino

La derivatización fluorescente de PSA a través de sus grupos amino, se llevó a cabo con los derivados de pirilio denominados comercialmente *Chamaleon*, que habían sido aplicados por algunos autores a la derivatización fluorescente de diferentes proteínas [38, 39, 55, 56], en algunos casos a concentraciones de tan solo 10 ng/ml en la muestra.

3.3.2.2.1. Marcado con Chromeo P503

El reactivo fluorogénico derivado de pirilio Chromeo P503, en adelante P503 cuya estructura se muestra en la Figura 3.18, presenta un rendimiento cuántico inferior al 1% cuando se encuentra libre en disolución y experimenta un drástico aumento, hasta aproximadamente un 50%, cuando se conjuga con los grupos amino primarios. Esta característica lo hace especialmente interesante para la derivatización fluorescente de proteínas en-capilar o pre-capilar, ya que no requiere su eliminación de la muestra tras la reacción de marcaje. El colorante libre presenta máximos de absorción y emisión a 612 y 665 nm, respectivamente, que se desplazan a 503 y 600 nm cuando se encuentra unido a proteínas. La reacción con los grupos amino de las proteínas es rápida a temperatura ambiente. Adicionalmente, el reactivo P503 presenta una carga positiva en su estructura que es sustituida por la carga positiva presente en las aminos con las que reacciona. Por tanto, el pI de la proteína no se vería modificado, así como en principio no deberían verse modificadas tampoco sus propiedades electroforéticas. La Figura 3.18 muestra, a modo de ejemplo, el esquema de reacción del colorante P503 con uno de los grupos amino primarios de los residuos de lisina presentes en el PSA.

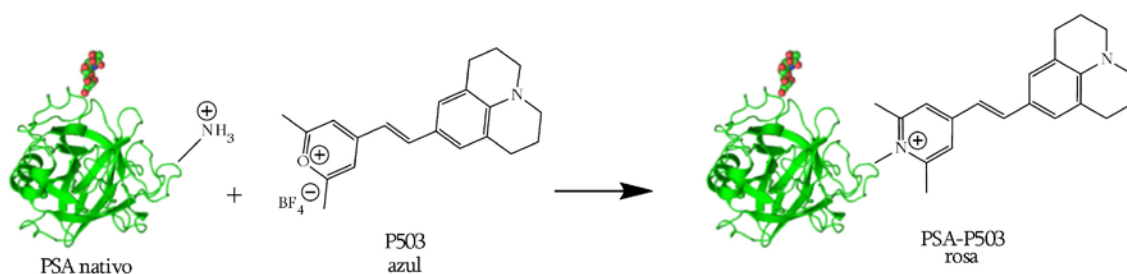


Figura 3.18. Esquema de la reacción del colorante P503 con los grupos amino de los residuos lisina presentes en el PSA.

En cuanto a reactividad, los colorantes Chromeo no son reactivos frente a otros nucleófilos presentes en las proteínas, como por ejemplo los grupos tiol de los

residuos de cisteína. Además, solamente la reacción con grupos amino primarios conduce a la formación del anillo de piridinio responsable de la emisión fluorescente del producto de derivatización. Las aminas secundarias pueden reaccionar aunque producen únicamente la apertura del anillo de pirilio, dando lugar a un producto no fluorescente, y las aminas terciarias no son reactivas frente al colorante [55].

En este trabajo, la derivatización fluorescente del PSA con el colorante P503 se trató de llevar a cabo por dos procedimientos distintos: en un procedimiento pre-capilar y en un procedimiento en-capilar.

3.3.2.2.1.1. Procedimiento pre-capilar

La reacción de derivatización fluorescente del PSA con el colorante P503 se optimizó en términos de sensibilidad de detección y resolución electroforética de las isoformas de la glicoproteína derivatizada. Para ello se estudiaron diversos parámetros de reacción, tales como tiempo y temperatura, así como naturaleza del medio de reacción y la relación en moles colorante/moles proteína (exceso de colorante). La reacción de los grupos amino primarios con el colorante P503 ha sido descrita en la bibliografía [38] como rápida y eficiente incluso a temperatura ambiente. El pH óptimo al que tiene lugar se encuentra en el intervalo 8-9, aunque el medio más empleado que aparece en la literatura es el tetraborato a concentración mM, es decir, a un pH aproximado de 9,2. Para poner a punto la reacción de derivatización de PSA se partió de una relación de P503 40:1 en moles frente a la glicoproteína (0,4 mg/ml, teniendo en cuenta el volumen total en la mezcla de reacción correspondiente a la alícuota de patrón de PSA 0,5 mg/ml), suficiente para que se produzca la reacción según los datos de la bibliografía, en un medio tetraborato 2,5 mM a pH 9,2 y mantenido a temperatura ambiente.

En la Figura 3.19, se muestran los electroferogramas tras la derivatización de PSA con P503 a temperatura ambiente durante 30 y 60 minutos. El análisis por CE-LIF del blanco de reacción (proceso de derivatización con P503 en ausencia de PSA)

mostró la ausencia de picos electroforéticos debidos al colorante o a subproductos de reacción. A ambos tiempos de reacción se pudo observar un pico ancho con hombros poco resueltos debido al PSA derivatizado. También se pudo comprobar que, a medida que aumenta el tiempo de reacción, la derivatización del PSA avanza, de modo que algunas de las isoformas comienzan a resolverse y la emisión fluorescente es más intensa.

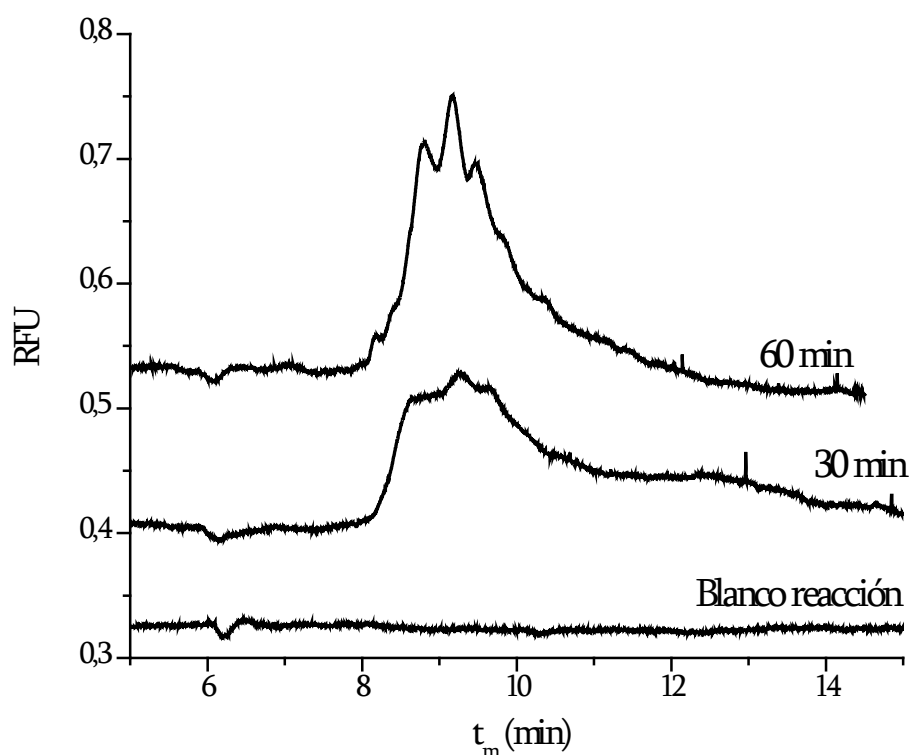


Figura 3.19. Análisis por CE-LIF de PSA 0,4 mg/ml tras su derivatización con P503, en una relación en moles de 40:1 frente a la proteína, a temperatura ambiente en tampón tetraborato 2,5 mM (pH 9,2) y de la disolución de blanco de reacción. BGE y condiciones de separación como en la Figura 3.10.

A continuación, se estudio el efecto sobre el análisis por CE-LIF del PSA derivatizado con P503 de dos medios diferentes de reacción, tetraborato sódico 2,5 mM a pH 9,2 y bicarbonato sódico 100 mM a pH 8,3. Los resultados se muestran en la Figura 3.20. Hay que tener en cuenta que en ambos casos la temperatura de reacción fue 37°C y el tiempo de reacción de 60 minutos. El pH 8,3 es el que

recomienda el fabricante como óptimo para la reacción con P503, probablemente porque es el pH al que reacciona mayor número de grupos amino de la proteína, permitiendo obtener así mayor sensibilidad. Sin embargo, en nuestro caso (Figura 3.20) la derivatización a este pH conduce a una banda ensanchada sin ninguna resolución, mientras que en un medio tetraborato a pH 9,2 en las mismas condiciones de reacción, se puede ver una ligera mejora en la resolución y un ligero aumento en la sensibilidad si lo comparamos con los análisis mostrados en la Figura 3.19, correspondientes a la derivatización a menor temperatura (temperatura ambiente).

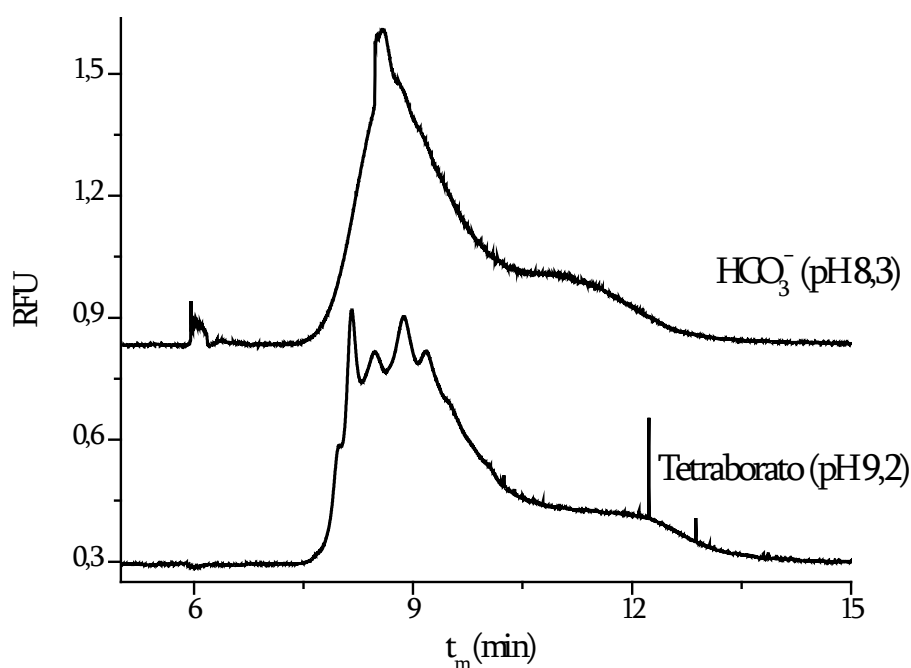


Figura 3.20. Análisis por CE-LIF de PSA 0,4 mg/ml tras su derivatización con P503 a 37°C durante 60 min y diferentes medios. BGE y condiciones de separación como en la Figura 3.10.

Estos resultados parecen indicar que el proceso de marcado fluorescente de PSA con P503 avanza lentamente a medida que se aumentan tiempo y temperatura de reacción. En el caso de la pérdida de resolución producida por la reacción a pH 8,3, se podría pensar que habiendo estado mayor número de grupos lisina

involucrados en la reacción, la mezcla de productos fluorescentes podría ser más heterogénea, ensanchando los diferentes picos de isoformas de PSA derivatizado y produciendo finalmente una única banda electroforética. Sin embargo, esta conclusión es preliminar y debería ser confirmada con estudios más detallados. En cualquier caso, únicamente en un medio tetraborato pudo observarse resolución incipiente de isoformas de PSA derivatizado. En consecuencia, se eligió una solución de tetraborato sódico 2,5 mM (pH 9,2) como medio de reacción para el estudio del efecto de las restantes condiciones de reacción entre el PSA y el P503.

Se procedió después al estudio del efecto del tiempo de derivatización. La Figura 3.21, muestra los análisis por CE-LIF de PSA derivatizado con P503 a 37°C durante diferentes tiempos.

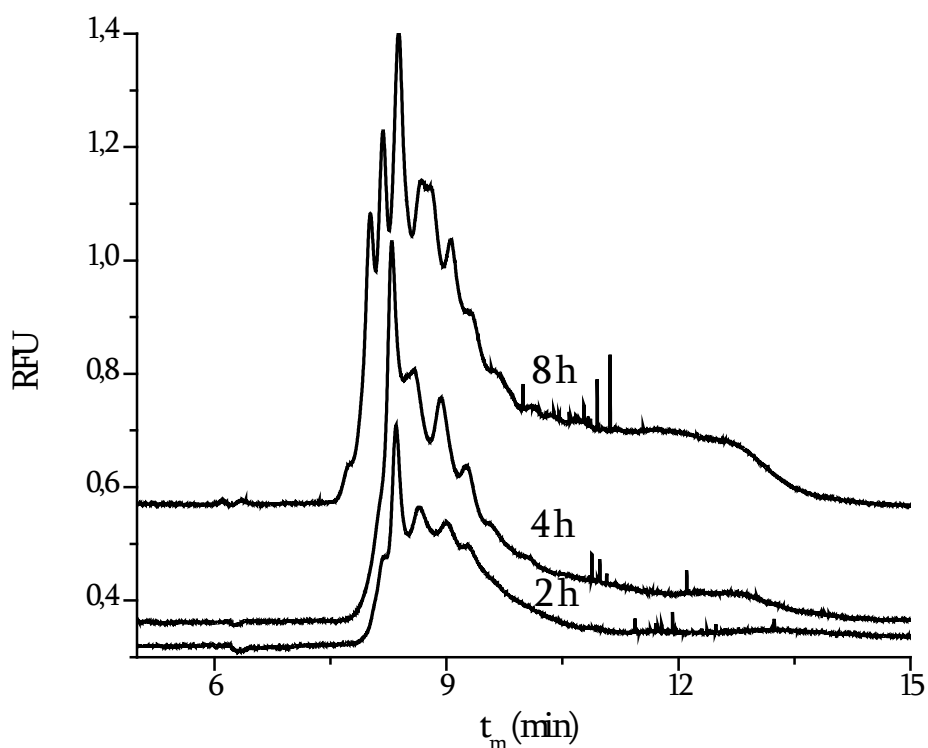


Figura 3.21. Análisis por CE-LIF de PSA 0,4 mg/ml tras su derivatización con P503, en una relación en moles de 40:1 frente a la proteína, en tetraborato 2,5 mM (pH 9,2) a 37°C durante tiempos diferentes. BGE y condiciones de separación como en la Figura 3.10.

Como cabía esperar, a medida que aumenta el tiempo de reacción la intensidad de fluorescencia del PSA derivatizado aumenta. También se observa un aumento de la resolución de los diferentes picos. Para 8 horas de reacción, la resolución es considerablemente mejor, aunque la señal de fluorescencia no aumenta en comparación con un tiempo de 4 horas, lo que puede indicar una derivatización más homogénea de los residuos lisina implicados, pero no un mayor número de grupos amino distintos involucrados en el marcado fluorescente.

Como un tiempo de reacción de 8 horas resulta excesivamente largo para una derivatización fluorescente, se estudió el efecto del exceso de reactivo fluorogénico sobre el rendimiento de la reacción. En la Figura 3.22 se muestran los electroforegramas correspondientes a la derivatización de PSA durante 4 horas con excesos de P503 respecto a la glicoproteína de 40:1 y 80:1, en las mismas condiciones de reacción anteriores. Como se puede observar, un mayor exceso de colorante no proporciona una mayor altura de pico y la resolución empeora notablemente. También se puede ver en este último electroferograma el incremento en altura del pico ensanchado que migra a algo más de 12 minutos. Este pico ya se podía observar en análisis anteriores, por ejemplo en la reacción a 37°C durante 8 horas (Figura 3.21). Este pico podría estar relacionado con la presencia de impurezas en el patrón, a la degradación de la glicoproteína o a subproductos derivados de la reacción de derivatización.

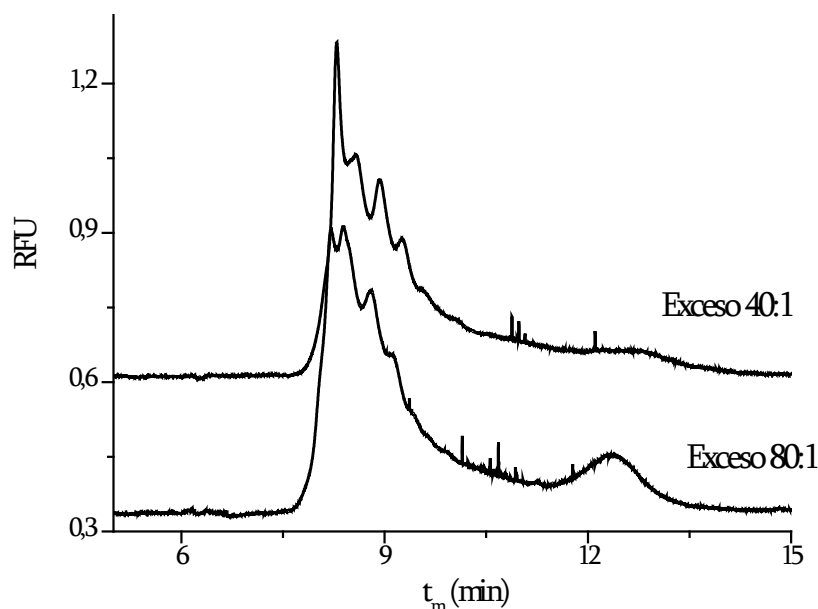


Figura 3.22. Análisis por CE-LIF de PSA 0,4 mg/ml tras su derivatización con P503 en tampón tetraborato 2,5 mM (pH 9,2) a 37°C, durante 4 h y diferentes excesos de colorante. BGE y condiciones de separación como en la Figura 3.10.

A continuación, se trató de forzar la reacción de derivatización fluorescente con un aumento de temperatura, a 50 y 60°C, manteniendo un exceso de colorante respecto al PSA de 40:1. En la Figura 3.23, se muestra el efecto de la temperatura de reacción sobre el electroferograma de PSA derivatizado. La reacción a 50°C muestra la separación de 7 isoformas de PSA marcado con P503, con la mejor resolución alcanzada hasta el momento para la proteína derivatizada. Sin embargo, la altura de los picos no parece aumentar demasiado con respecto a las condiciones estudiadas anteriormente. Este resultado parece indicar que la reacción de derivatización no avanza más allá de lo obtenido en la reacción a 37°C, quizá porque en el caso del PSA los residuos lisina involucrados en la reacción sean un número reducido. Sin embargo, la derivatización en estas condiciones resulta bastante homogénea, es decir que los pocos grupos lisina involucrados parece que estén siendo marcados de forma bastante significativa sin generar múltiples productos de derivatización y que, además, como se esperaba del P503, no se estén modificando las propiedades electroforéticas de las isoformas de PSA tras la derivatización, lo que permite

obtener la separación de diferentes isoformas de la glicoproteína marcada fluorescentemente.

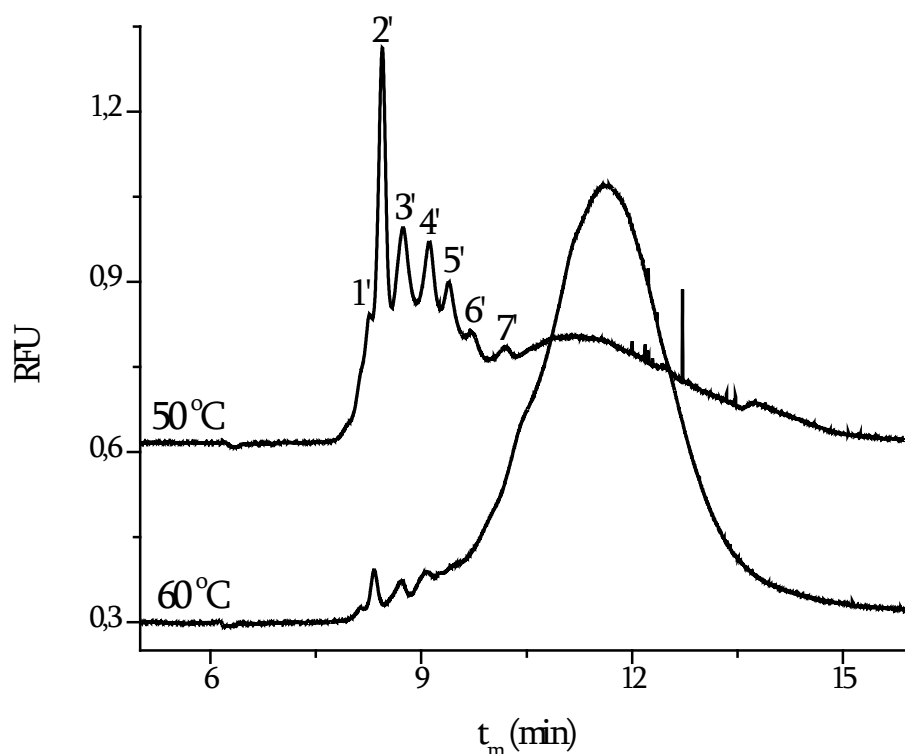


Figura 3.23. Análisis por CE-LIF de PSA 0,4 mg/ml tras su derivatización con P503 en tampón tetraborato 2,5 mM (pH 9,2) a 50 y 60°C, durante 4 h y con un exceso de colorante respecto a PSA de 40:1. BGE y condiciones de separación como en la Figura 3.10.

Otro resultado interesante aparece en el análisis por CE-LIF de la derivatización de PSA a 60°C, con la resolución aparente de algunas de las isoformas de PSA, con una altura de pico muy pequeña y la aparición del pico ensanchado alrededor de 12 minutos, ya comentado anteriormente, con una intensidad extraordinariamente aumentada. A esta temperatura, es posible que este pico ensanchado se deba a que la glicoproteína haya sufrido algún proceso de desnaturalización. A la vista de este resultado, se eligió la temperatura de 50°C como la más adecuada para llevar a cabo la reacción de derivatización de PSA con P503.

Posteriormente se estudió el efecto de la concentración de PSA sobre el proceso de derivatización fluorescente con P503. Para ello, se realizó la derivatización a 50°C durante 4 horas de disoluciones de glicoproteína de concentraciones de 0,05, 0,25, 0,5 y 1 mg/ml, primero con el mismo exceso de colorante para todas ellas (40:1) y, en un segundo experimento, con un exceso diez veces mayor para la disolución más diluida de PSA. Los resultados revelaron un cambio no lineal de la relación S/N máxima (correspondiente a la altura del pico mayoritario en cada caso) respecto a la concentración de PSA sometido a reacción (Figura 3.24). Esta observación confirma el hecho de que el rendimiento de reacción en la derivatización fluorescente decrece con la concentración de PSA. Las concentraciones de PSA indicadas corresponden a las concentraciones de glicoproteína derivatizada inyectadas en el sistema de CE-LIF. Este intervalo de concentración de glicoproteína una vez derivatizada (0,04 a 0,8 mg/ml teniendo en cuenta el volumen de disolución de colorante añadido), corresponde al intervalo 0,05 a 1 mg/ml de glicoproteína que se somete al proceso de derivatización. El efecto que la concentración de la glicoproteína tiene sobre la señal de fluorescencia es más evidente a las concentraciones más bajas del intervalo estudiado. De una concentración de PSA de 0,4 a 0,2 mg/ml tras su derivatización, la S/N disminuye casi diez veces y para una concentración de 0,04 mg/ml ya no se observaron picos de PSA derivatizado, en ninguno de los excesos de colorante ensayados. Por tanto, aun cuando la sensibilidad obtenida para PSA derivatizada a una concentración de 0,4 o 0,8 mg/ml es unas 4 o 5 veces superior a la que se obtiene por CE-UV de la glicoproteína nativa, el LOD del método es muy próximo a 0,2 mg/ml, equiparable al que se obtiene con detección UV como ocurría con la derivatización de AGP con 5-IAF, descrita en la sección 3.3.2.1.1.1.

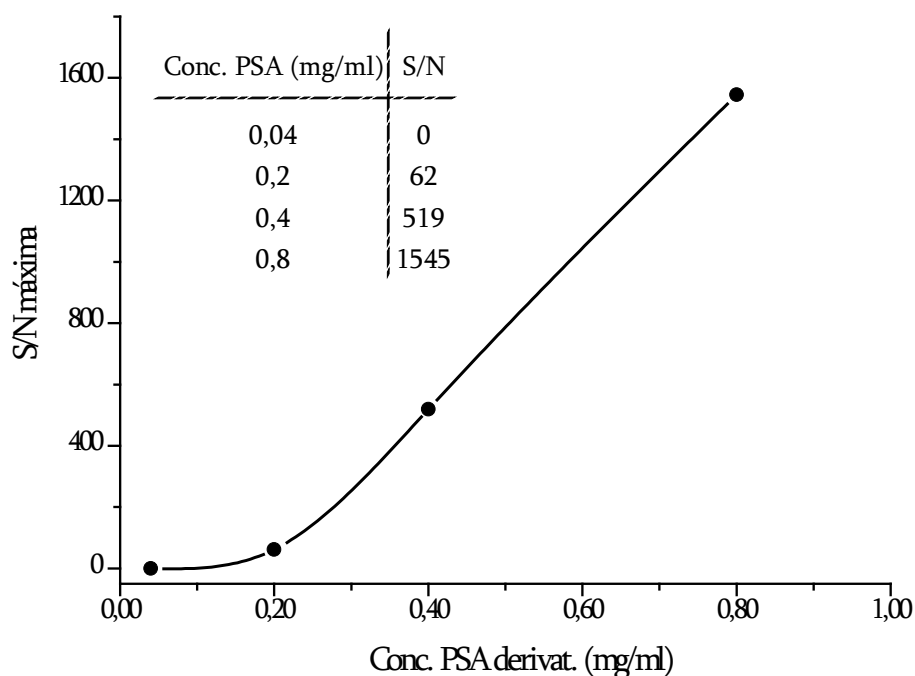


Figura 3.24. Relación S/N obtenida para el pico mayoritario en los análisis por CE-LIF de PSA tras la derivatización de cantidades crecientes de la glicoproteína con P503. Condiciones de reacción: tampón tetraborato 2,5 mM (pH 9,2) a 50°C, durante 4 h y con un exceso de colorante de 40:1. BGE y condiciones de separación como en la Figura 3.10.

La resolución obtenida para las isoformas de PSA derivatizado con P503 y sin derivatizar se puede observar en la Figura 3.25. La resolución de las isoformas del PSA derivatizado (valores entre 0,55-0,92, no referidos a la línea de base) presenta una ligera disminución con respecto a la de las isoformas del PSA sin derivatizar (valores entre 0,56-1,15) analizado por CE-UV. Además, se deja de observar una separación clara de la primera isoforma (minoritaria), aunque todavía se observan pequeños hombros antes del pico 1' con muy poca resolución. Sin embargo, se obtiene la separación de 7 de las isoformas del PSA tras su marcado con P503.

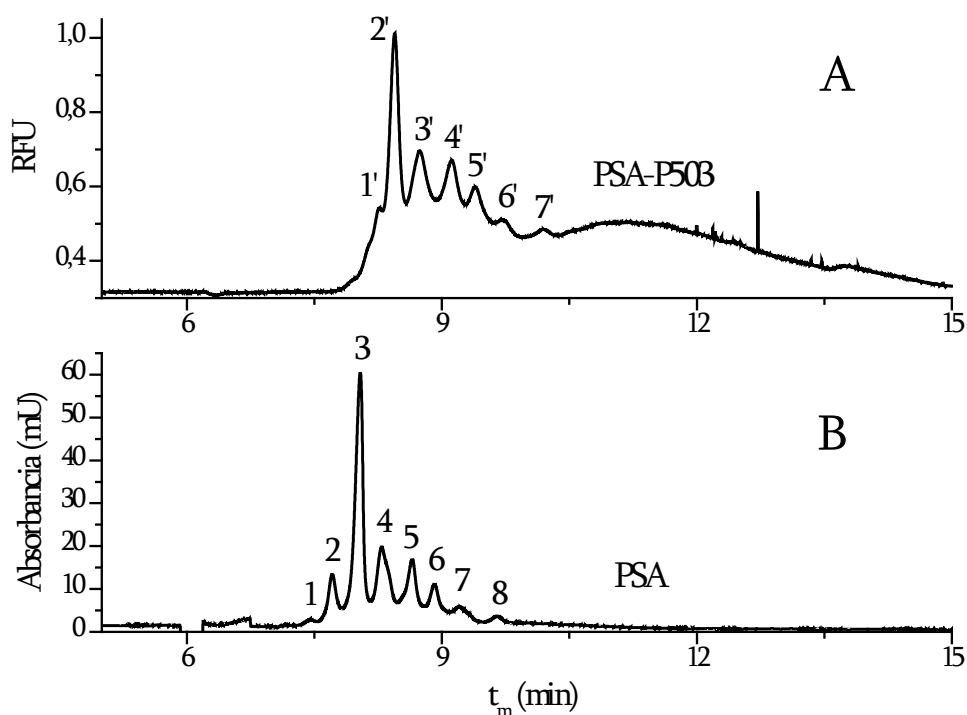


Figura 3.25. (A) Análisis por CE-LIF de PSA 0,4 mg/ml derivatizado con P503 en tampón tetraborato 2,5 mM (pH 9,2) a 50°C durante 4 h y un exceso de 40:1. (B) Análisis por CE-UV de PSA patrón 1 mg/ml. BGE y condiciones de separación como en las Figuras 3.10, para análisis CE-LIF y 3.16 para análisis CE-UV.

En resumen, las condiciones seleccionadas como óptimas para llevar a cabo la reacción de derivatización pre-capilar de PSA con el colorante P503 fueron: tampón tetraborato 2,5 mM (pH 9,2) como medio de reacción, un exceso en moles de colorante respecto a la proteína de 40:1 y 50°C durante 4 horas.

Posteriormente se estudió la repetibilidad del método de derivatización con P503 sobre tres alícuotas individuales de glicoproteína en concentración 0,5 mg/ml (0,4 mg/ml en la mezcla de reacción), llevando a cabo la reacción en las condiciones óptimas comentadas en el párrafo anterior. Los resultados de repetibilidad intra-día ($n=3$), del análisis CE-LIF para una misma alícuota de PSA derivatizado y repetibilidad inter-día ($n=3$), para la derivatización de tres alícuotas diferentes, se muestran en la Tabla 3.1, en la que se pueden observar los datos obtenidos para los valores medios (M) de t_m y $\%A_{corr}$ para cada una de las isoformas. Los valores de RSD

obtenidos para el t_m en el análisis intra-día, para una misma alícuota, son inferiores al 2% en todos los casos, así como los valores de RSD para $\%A_{corr}$ varían entre 1,8-5,2%. Estos valores, aunque superiores comparados con el análisis en las mismas condiciones de PSA sin derivatizar (ver Sección 1.3.3.2 del Capítulo 1), son aceptables para ambos parámetros electroforéticos en el análisis por CE de isoformas de glicoproteínas. El aumento en los valores de RSD para ambas magnitudes, con respecto al análisis por CE-UV de PSA patrón, podría deberse en parte a la disminución de la resolución, lo que dificulta considerablemente la integración de los picos.

Tabla 3.1. Media y RSD (%) para los valores de t_m y $\%A_{corr}$ para cada una de las isoformas detectadas por CE-LIF de PSA 0,4 mg/ml tras su derivatización con P503 en tampón tetraborato 2,5 mM (pH 9,2) a 50°C, durante 4 h y un exceso de colorante de 40:1. BGE y condiciones de separación empleadas en el análisis por CE-LIF como en la Figura 3.10.

Isoforma	Intra-día (n=3)				Inter-día (n=3)			
	t_m		$\%A_{corr}$		t_m		$\%A_{corr}$	
	M (min)	RSD (%)	M (%)	RSD (%)	M (min)	RSD (%)	M (%)	RSD (%)
1'	8,24	1,6	8,77	4,2	8,81	5,7	10,01	13,1
2'	8,42	1,7	21,99	1,8	9,01	5,8	21,83	1,0
3'	8,72	1,7	20,05	3,2	9,30	5,7	20,10	2,5
4'	9,09	1,7	16,51	2,1	9,80	6,5	16,99	2,6
5'	9,36	1,7	13,48	2,2	10,10	6,6	11,53	14,9
6'	9,68	1,7	9,75	3,1	10,49	6,8	9,87	1,1
7'	10,16	1,9	9,46	5,2	11,06	7,2	9,67	2,3

Por otro lado, los valores de RSD obtenidos para el t_m en el análisis inter-día oscilan entre 5,7-7,2%, mientras que los valores de RSD obtenidos para $\%A_{corr}$ se encuentran entre 1,0-14,9%. Los valores de RSD más elevados para el t_m en el caso del análisis de tres alícuotas diferentes de PSA derivatizado (inter-día), podrían estar

relacionados con el ligero ensanchamiento que sufren las isoformas de PSA tras su derivatización, que podría ser debido a su vez a diferentes especies químicas producidas en la reacción y que migran bajo cada pico electroforético. Los valores de RSD para $\%A_{\text{corr}}$ en análisis inter-día, son muy similares a los obtenidos para una misma alícuota de PSA derivatizado (intra-día) salvo en el caso de dos isoformas, la 1' y la 5', para las cuales el RSD es considerablemente mayor. El RSD elevado para $\%A_{\text{corr}}$ podría estar relacionado con una baja resolución o con una asimetría de pico, lo que dificulta integrar con precisión.

En cualquier caso, hay que tener en cuenta que los valores inter-día recogen la variabilidad debida al análisis CE-LIF y, especialmente, la debida al proceso de derivatización fluorescente.

3.3.2.2.1.2. Procedimiento en-capilar

Los procedimientos de preparación de muestra acoplados a los sistemas de análisis basados en técnicas de separación, presentan enormes ventajas frente a los procedimientos realizados previos o posteriormente al proceso de separación. Entre estas ventajas pueden citarse la automatización de todo el proceso analítico, el ahorro de tiempo y la disminución del coste del análisis. A pesar de esto, en el caso de la derivatización fluorescente, los procedimientos más empleados hoy en día continúan siendo los que en esta Memoria se han denominado pre-capilar. La razón puede residir en la dificultad que en ocasiones plantean las incompatibilidades entre los medios y condiciones de derivatización y separación. Una prueba de ello se puede encontrar para el caso concreto del empleo de los colorantes Chromeo para la derivatización de HSA en ambos procesos, pre- y en-capilar [38]. Los autores alcanzaron un LOD del método de derivatización pre-capilar de unos pocos ng/ml de proteína, mientras que solo pudo detectarse la proteína derivatizada en-capilar a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$. Los autores atribuyen, como posible causa de la sensibilidad tan dispar entre procedimientos, las limitaciones instrumentales que

imposibilitan trasladar las condiciones aplicadas en el proceso pre-capilar, al método de derivatización en-capilar. Sin embargo, hay antecedentes en el laboratorio donde se ha desarrollado esta Tesis en los que se ha mostrado una elevada sensibilidad cuando se realizaba el marcado fluorescente de β -lactoglobulina con el agente fluorogénico FQ en un procedimiento en-capilar, proporcionando un LOD de 0,5 nM [42].

Como se puede deducir revisando la bibliografía, la efectividad de los métodos de derivatización fluorescente tanto en- como pre-capilar es muy variable, ya que, mientras que unos métodos de derivatización o algunos colorantes para el marcado fluorescente proporcionan una elevada sensibilidad para algunas proteínas, para otras proteínas no la proporcionan en absoluto. Este hecho deriva de la tremenda complejidad de estas moléculas biológicas y pone de manifiesto la dificultad de encontrar un método de derivatización fluorescente universal, que sea válido para todas las proteínas.

Teniendo en cuenta los antecedentes en nuestro laboratorio que se han mencionado, se trató de trasladar el procedimiento pre-capilar de derivatización de PSA con P503 a un método de derivatización en-capilar, compatible con la separación electroforética de esta proteína. Para ello se empleó el método EMMA, mencionado en la Introducción General de esta Memoria, que consiste básicamente en una reacción controlada por medio de electroforesis [57]. En este método, los reactivos introducidos en el capilar se mezclan gracias a sus diferentes μ_{ef} , permitiendo la reacción entre ellos. El rendimiento de la reacción depende de un número elevado de factores tales como la velocidad con que se mezclan ambos reactivos, el medio en el que se introducen y la temperatura en la que se encuentra el medio de reacción en el momento de la mezcla. En la Figura 3.26 se muestra un esquema simplificado de los pasos seguidos en un método de EMMA, aplicado a la derivatización fluorescente de PSA con P503.

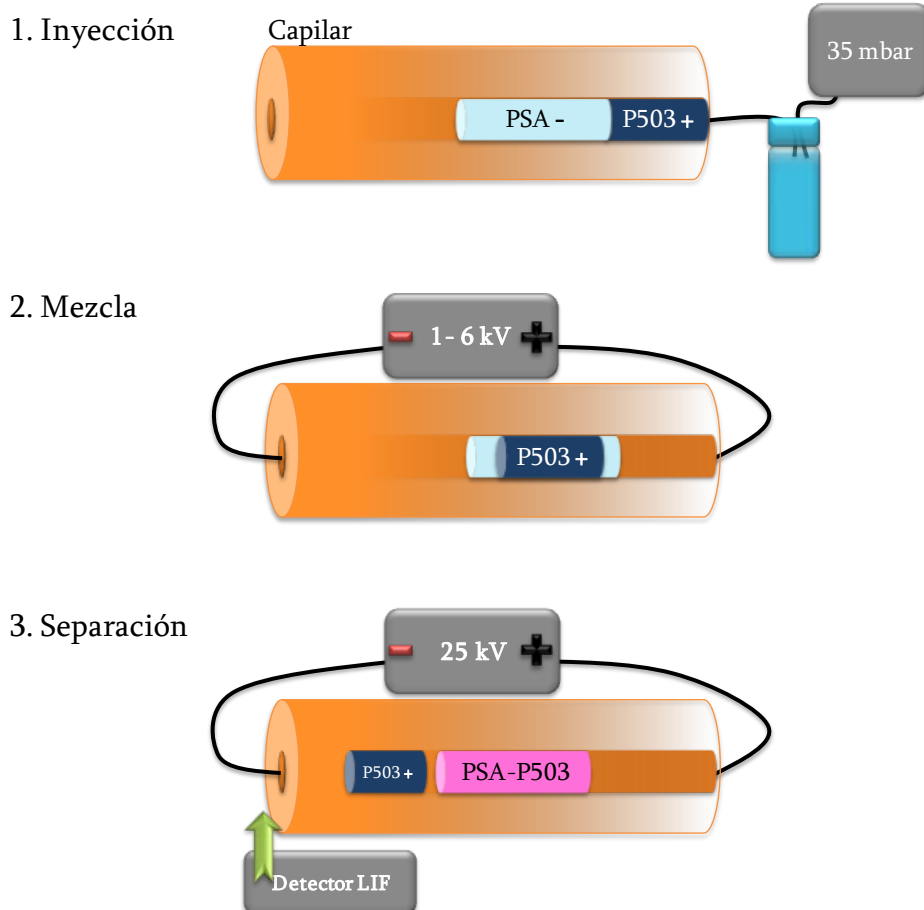


Figura 3.26. Esquema del método de EMMA, aplicado a la derivatización en-capilar de PSA con P503: 1) Inyección, 2) Mezcla y 3) Separación.

En presencia de EOF, se inyecta hidrodinámicamente en primer lugar el PSA en un tampón de tetraborato sódico 2,5 mM (pH 9,2), en el cual presentarán carga negativa todas sus isoformas. A continuación se inyecta el colorante P503 disuelto en metanol, que presenta carga positiva. Cuando se conecta el campo eléctrico a un voltaje moderado, de 1 a 6 kV, PSA y P503 se mueven hacia el cátodo con velocidades diferentes. La glicoproteína, que presenta carga negativa y por tanto una μ_{ef} de signo opuesto a la μ_{EOF} , estará más atraída por el ánodo y se moverá con menor velocidad hacia el cátodo, mientras que el colorante, con carga positiva, se moverá con mayor velocidad hacia éste. El resultado es que el colorante, inyectado en segundo lugar, se mezcla con el PSA debido a su mayor velocidad de migración en las condiciones de mezcla. Esta mezcla se lleva a cabo con muy poca difusión

molecular. Cuando ambos reactivos están mezclados se detiene el voltaje de mezcla, para permitir la reacción de derivatización. Después de un tiempo determinado sin aplicar voltaje, propiamente denominado tiempo de reacción, se aplica el voltaje de separación, 25 kV en la figura, para el análisis por CE-LIF del PSA derivatizado. Puesto que la separación de isoformas de PSA se realiza a 35°C, la reacción de derivatización se llevó a cabo a esta misma temperatura.

En la Figura 3.27 se muestra el resultado para la derivatización en-capilar de PSA con P503, con un tiempo de mezcla de 150 s a 1 kV y un tiempo de reacción de 5 minutos. El perfil de isoformas de PSA derivatizado es muy similar, en cuanto a resolución, al que se obtuvo con la derivatización pre-capilar, observándose la separación de 7 isoformas de la glicoproteína marcada con el colorante P503. En el caso de la derivatización en-capilar, no se observó en ningún caso el pico ensanchado (a aproximadamente 12 min) que aparecía justo después del perfil de isoformas en la derivatización pre-capilar, en cualquiera de las condiciones estudiadas. La razón podría ser que en el interior del capilar, la temperatura y tiempo de reacción menores impiden la degradación de la glicoproteína y la formación de los subproductos de derivatización que probablemente sean los responsables de la aparición de ese pico. En cuanto a sensibilidad, se observó un ligero aumento respecto a la reacción llevada a cabo fuera del capilar, pero no lo suficiente para poder mejorar notablemente el LOD.

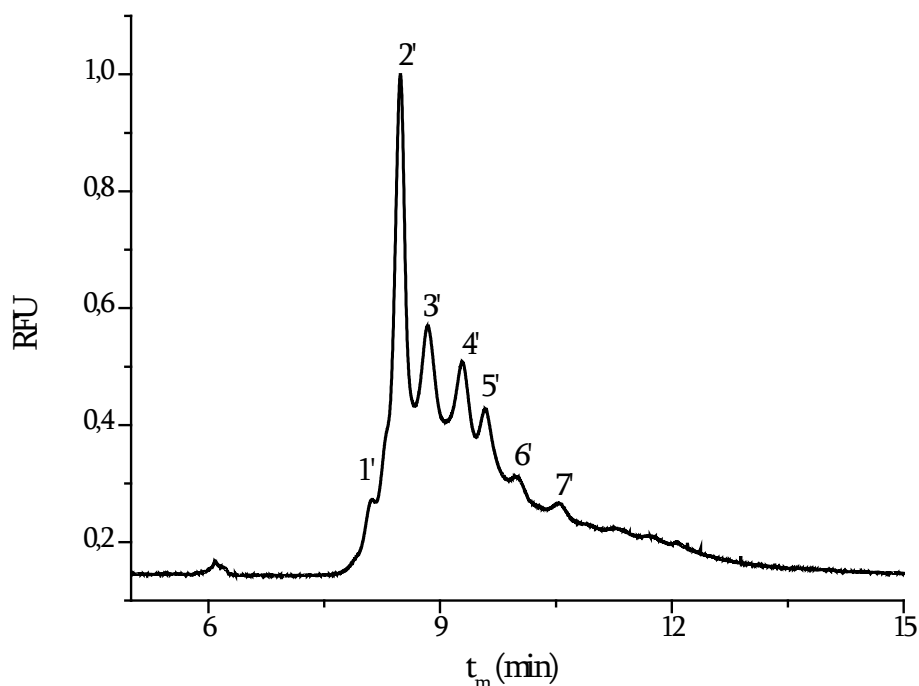


Figura 3.27. Análisis por CE-LIF de PSA 0,5 mg/ml derivatizado en-capilar con P503. Condiciones de derivatización: 30 s de inyección de PSA en tampón tetraborato 2,5 mM (pH 9,2) y 7 s de inyección de P503 disuelto en metanol, ambos a 35 mbar; voltaje de mezcla 1 kV durante 150 s; tiempo de reacción 5 min. BGE y resto de condiciones de separación como en la Figura 3.10.

Con el fin de mejorar la sensibilidad del análisis, sin perder resolución entre las isoformas de PSA derivatizado, se procedió a optimizar algunas de las variables involucradas en la derivatización en-capilar con P503. Para ello, se estudió el efecto del tiempo de mezcla, tiempo de reacción, longitud del *plug* de inyección para las disoluciones de PSA y P503 y por último el voltaje de mezcla.

En primer lugar se trató de optimizar el tiempo de mezcla aplicando un voltaje de 1 kV, manteniendo el tiempo de reacción en 5 minutos. Los tiempos de inyección de ambos reactivos en el capilar a 35 mbar fueron de 30 s para el PSA y 7 s para el colorante P503, dando lugar a una relación de colorante 40:1 en moles frente a la glicoproteína, la misma relación que se empleó para la derivatización pre-capilar. En la Figura 3.28 se muestran los valores obtenidos para las relaciones S/N del pico mayoritario obtenidas en los diferentes análisis por CE-LIF de PSA derivatizado

en-capilar con P503, empleando diferentes tiempos de mezcla entre 0,5 y 4,5 minutos.

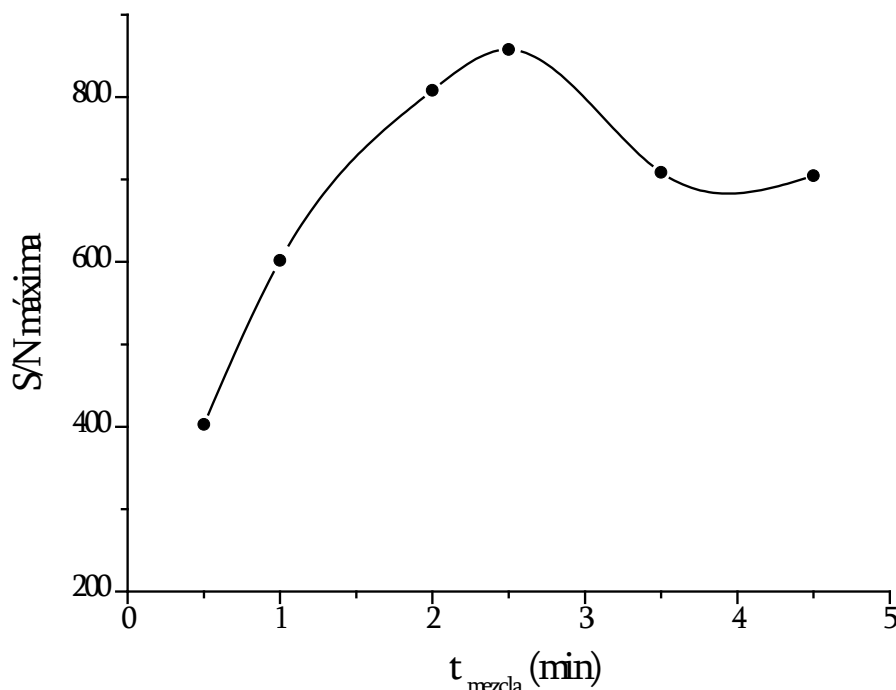


Figura 3.28. Variación de la relación S/N con el tiempo de mezcla. El valor S/N se determinó para el pico mayoritario en el análisis por CE-LIF de PSA 0,5 mg/ml derivatizado en-capilar con P503. Condiciones de derivatización: 30 s de inyección de PSA en tampón tetraborato 2,5 mM (pH 9,2) y 7 s de inyección de P503 en metanol, a 35 mbar; voltaje de mezcla 1 kV; tiempo de reacción 5 min. BGE y resto de condiciones de separación como en la Figura 3.10.

Como se puede observar, la sensibilidad aumenta con el tiempo de mezcla de la reacción de derivatización en-capilar, alcanza un máximo a 2,5 minutos y a partir de 3,5 minutos se mantiene prácticamente constante. De esta observación se deduce que el PSA reacciona con el colorante a medida que éste atraviesa la muestra de glicoproteína, siendo a 2,5 minutos el tiempo en que se produce el mejor contacto entre ambos *plugs* de reactivos. A un tiempo mayor, es posible que el colorante salga de la zona en que se encuentra localizada la glicoproteína. Por tanto, el análisis por CE-LIF que se muestra en la Figura 3.27 corresponde a la derivatización de PSA en-capilar con P503, en el tiempo de mezcla óptimo.

El tiempo de reacción aplicado en los primeros ensayos fue muy breve, de 5 minutos, en comparación con el tiempo aplicado en la reacción pre-capilar; por ello se estudió el efecto de este tiempo sobre la sensibilidad de detección. La Figura 3.29 muestra la influencia sobre la sensibilidad del tiempo de reacción, entre 5 y 60 minutos, con un tiempo de mezcla de 2,5 minutos.

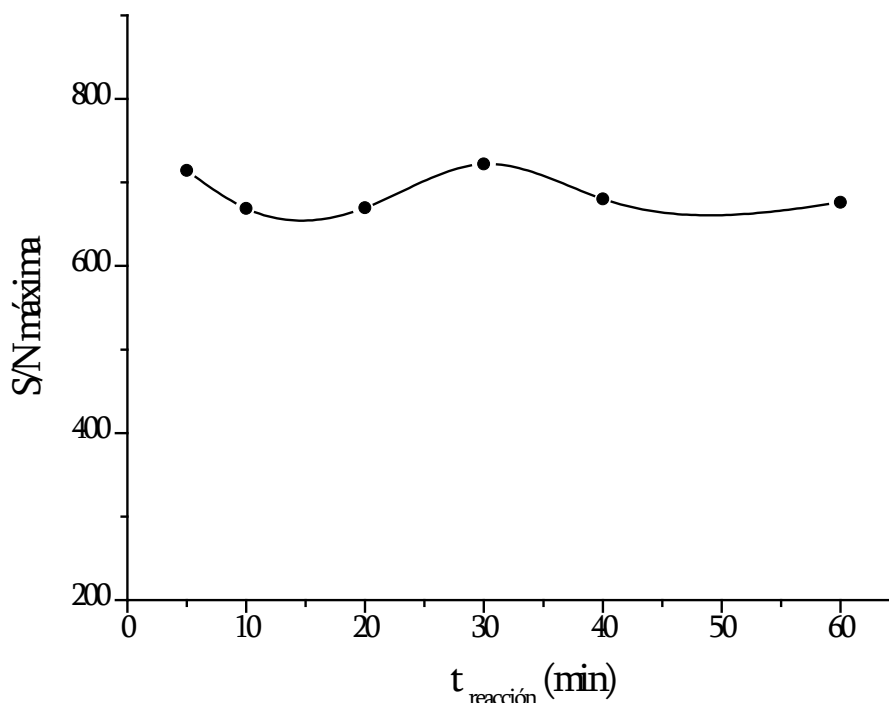


Figura 3.29. Relación S/N obtenida para el pico mayoritario en el análisis por CE-LIF de PSA 0,5 mg/ml derivatizado en-capilar con P503 en diferentes tiempos de reacción. Condiciones de derivatización: 30 s de inyección de PSA en tampón tetraborato 2,5 mM (pH 9,2) y 7 s de inyección de P503 en metanol, a 35 mbar; voltaje de mezcla 1 kV durante 2,5 min. BGE y resto de condiciones de separación como en la Figura 3.10.

De los datos mostrados en la Figura 3.29 podemos concluir que el rendimiento de la reacción de derivatización de PSA con P503, en un procedimiento en-columna, es independiente del tiempo en que ambos reactivos están en contacto tras finalizar su mezcla por campo eléctrico. Con un tiempo de reacción de tan solo 5 minutos, se podría decir que la reacción se ha completado, para obtener una

sensibilidad muy similar a la que se obtiene en una derivatización pre-capilar tras 4 horas de reacción. La elevadísima velocidad a la que se produce la reacción en el interior del capilar, se puede atribuir al pequeño volumen que éste posee y en consecuencia, al confinamiento en el espacio que sufren los reactivos en su interior, lo que favorece la cinética de reacción. Aún así, parece que la derivatización de PSA con P503 no progresa más de lo que se obtiene realizando la derivatización fuera del capilar.

Con el fin de mejorar la sensibilidad de detección, se estudió el efecto de la longitud del *plug* de colorante sobre la reacción de derivatización realizada en el interior del capilar. Para ello, se inyectaron diferentes longitudes de *plug* de reactivo P503 modificando el tiempo de inyección, manteniendo constante la longitud del *plug* de PSA. Se estudiaron tiempos de inyección de la disolución de colorante de 4, 7 y 15 s. Los resultados se muestran en la Figura 3.30. Para un tiempo de inyección de 4 s de P503, menor que el empleado en ensayos anteriores (7 s), la sensibilidad se ve reducida, pues posiblemente la longitud del *plug* de P503 no sea lo suficientemente extensa para producir un solapamiento óptimo con el *plug* de PSA, si bien la resolución se ve ligeramente mejorada. En cambio, para un tiempo de inyección de 15 s del *plug* de colorante, se puede observar cómo la fluorescencia aumenta ligeramente de forma global para todas las isoformas de PSA derivatizado, indicando que un mayor número de residuos lisina han reaccionado. Sin embargo, en este último caso, la resolución se ve claramente degradada por el efecto de este aumento en la efectividad de reacción, un efecto que ya se había observado en la derivatización pre-capilar cuando se aumentó la concentración de colorante en la mezcla de reacción (Figura 3.22). Estos resultados nos indican que, aunque se aumente considerablemente la longitud del *plug* de inyección de P503, incrementando la probabilidad de reacción con el PSA durante la mezcla y el tiempo de reacción, la sensibilidad se mejora poco y además se pierde resolución.

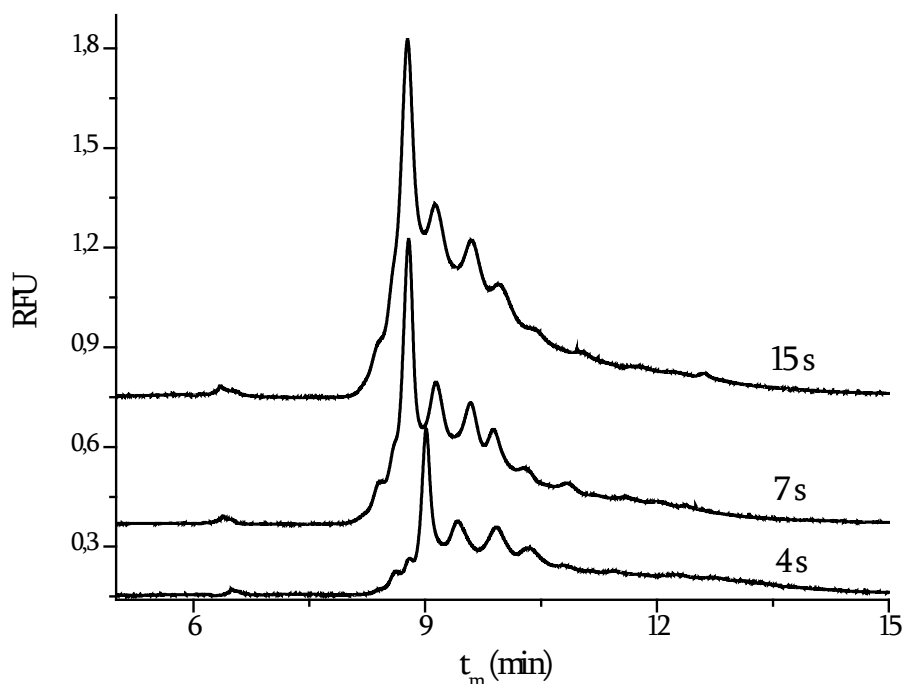


Figura 3.30. Análisis por CE-LIF de PSA 0,5 mg/ml derivatizado en-capilar con P503. Condiciones de derivatización: 30 s de inyección de PSA en tampón tetraborato 2,5 mM (pH 9,2) y 4, 7 y 15 s de inyección de P503 en metanol, a 35 mbar; voltaje de mezcla 1 kV durante 150 s; tiempo de reacción 5 min. BGE y resto de condiciones de separación como en la Figura 3.10.

En definitiva, en las condiciones de inyección y reacción empleadas hasta este momento, la reacción de derivatización parece alcanzar su máximo rendimiento muy rápidamente y no avanzar mucho más de lo obtenido en las condiciones iniciales (ver Figura 3.27), independientemente del tiempo de reacción y de la cantidad inyectada de P503.

A continuación, se trató de forzar la reacción de derivatización con un aumento de voltaje en la etapa de mezcla de reactivos. A este respecto, hay un estudio [48] que demuestra el efecto del voltaje sobre el rendimiento de derivatización fluorescente en-capilar, puesto que cuando se aumenta este parámetro se produce un aumento de temperatura en las interfaces de los *plugs* de inyección, producido por las diferentes conductividades de las distintas fases introducidas en el capilar, lo que podría favorecer la reacción entre glicoproteína y colorante. Los voltajes de mezcla estudiados, además de 1 kV para el cual ya se han presentado los

resultados, fueron 3 y 6 kV. Una vez se modifica este voltaje, es necesario replantear los tiempos de mezcla, ya que los analitos se moverán con una v_{ef} diferente y por tanto el tiempo de mezcla óptimo cambia. Se aplicaron tiempos de mezcla en el intervalo 1-2 minutos para un voltaje de 3 kV y tiempos entre 0,25 y 1,25 minutos para un voltaje de mezcla de 6 kV, manteniendo el tiempo de reacción en 5 minutos. Una vez encontrado el tiempo de mezcla óptimo se procedió a estudiar el tiempo de reacción adecuado.

Para un voltaje de mezcla de 3 kV, durante un tiempo de 1,25 minutos, se observó un aumento en la S/N máxima de fluorescencia de aproximadamente dos veces respecto a la mezcla realizada a 1 kV, durante 2,5 minutos, demostrando la mayor efectividad de derivatización a un voltaje de mezcla mayor. Sin embargo, aumentando el voltaje hasta 6 kV, con un tiempo de mezcla óptimo de 0,75 minutos, la relación S/N máxima de fluorescencia ya no aumentó respecto a un voltaje de mezcla de 3 kV, poniendo de manifiesto una vez más que la reacción de derivatización de PSA con P503 no genera el rendimiento deseado. Además, los diferentes tiempos de reacción estudiados para 3 y 6 kV de voltaje de mezcla, de forma similar a lo que ocurría con un voltaje de 1 kV, no generaron rendimientos de derivatización superiores. Incluso a un tiempo 0 de reacción, la emisión fluorescente obtenida fue muy similar a la obtenida para tiempos tan largos como 30 min.

En la Figura 3.31 se muestra el perfil de isoformas obtenido en el análisis por CE-LIF del PSA derivatizado con P503, a un voltaje de mezcla de 6 kV aplicado durante 45 segundos y sin tiempo de reacción. Se obtuvo en estas condiciones la separación de 7 isoformas de PSA derivatizado, de la misma forma que en el resto de condiciones anteriores, pre- o en-capilar, en este caso con una sensibilidad dos veces superior a la obtenida en las condiciones iniciales de derivatización en-capilar. El resultado final es de un aumento de sensibilidad respecto al análisis de PSA nativo por CE-UV de algo menos de un orden de magnitud, cuando la concentración de PSA derivatizado es del orden de mg/ml. En términos de S/N, se obtuvieron valores

algo inferiores a 500, para la derivatización pre-capilar de PSA 0,4 mg/ml con P503 y próximos a 1000 para la derivatización en-capilar de PSA 0,5 mg/ml con P503, mientras que los que se obtuvieron para los análisis CE-UV de PSA 1 mg/ml fueron próximos a 250. En el procedimiento de derivatización en-capilar, se consiguió reducir el tiempo de reacción desde 4 horas, el óptimo para la derivatización realizada fuera del capilar, hasta tan solo 45 segundos, demostrando la enorme efectividad de la reacción llevada a cabo en un espacio confinado como es el interior del capilar. Evidentemente, la reacción de derivatización de PSA con el colorante P503, aunque alcance su máximo rendimiento muy rápidamente, no progresa lo suficiente para alcanzar un LOD aceptable en el análisis por CE-LIF, obteniéndose una sensibilidad final ligeramente mejor que la que se obtiene por CE-UV.

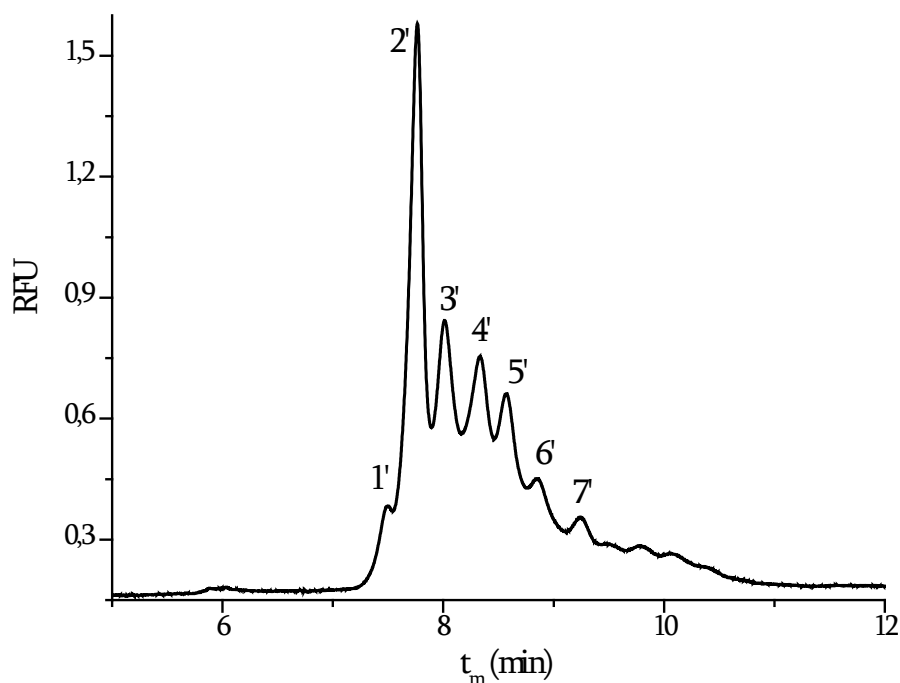


Figura 3.31. Análisis por CE-LIF de PSA 0,5 mg/ml derivatizado en-capilar con P503. Condiciones de derivatización: 30 s de inyección de PSA en tampón tetraborato 2,5 mM (pH 9,2) y 7 s de inyección de P503 en metanol, a 35 mbar; voltaje de mezcla 6 kV durante 45 s; tiempo de reacción 0 min. BGE y resto de condiciones de separación como en la Figura 3.10.

Finalmente, se estudiaron los datos de repetibilidad obtenidos para la derivatización en-capilar realizada en las condiciones indicadas en la Figura 3.31. Los resultados se muestran en la Tabla 3.2 para análisis realizados en un mismo día ($n=3$) y análisis realizados en días diferentes ($n=4$). Se obtuvieron buenos valores de RSD para el t_m , tanto en análisis intra-día como en inter-día, siendo superiores a los que se obtuvieron para el análisis por CE-UV del PSA sin derivatizar (Tabla 1.5), pero inferiores a los obtenidos para la derivatización pre-capilar (Tabla 3.1). También para $\%A_{corr}$ se obtuvieron valores aceptables de RSD, comparables a los publicados para el análisis por CE-UV de isoformas de glicoproteínas, en el intervalo 0,5-5,6% para análisis realizados en el mismo día y algo superiores para los análisis realizados en días diferentes, en el intervalo 0,6-10,5%. Estos últimos valores son también algo superiores a los que se obtuvieron para el análisis por CE-UV del PSA patrón, que no incluye la variabilidad inherente al proceso de derivatización pero son inferiores a los que se obtuvieron para el análisis por CE-LIF del PSA derivatizado fuera del capilar. Los mayores valores de RSD en $\%A_{corr}$ corresponden a las isoformas minoritarias, y en especial a la 1', lo que es probablemente debido al tamaño de ese pico y las dificultades para integrarlo.

Tabla 3.2. Media (M) y RSD (%) para los valores de t_m y $\%A_{corr}$ de cada una de las isoformas detectadas por CE-LIF de PSA 0,5 mg/ml en tampón tetraborato 2,5 mM (pH 9,2) tras su derivatización en-capilar con P503 en metanol. Condiciones de derivatización: 30 s de inyección de PSA y 7 s de inyección de P503, a 35 mbar; voltaje de mezcla 6 kV durante 45 s; tiempo de reacción 0 min. BGE y condiciones de separación empleadas en el análisis por CE-LIF como en la Figura 3.10.

Isoforma	Intra-día (n=3)				Inter-día (n=4)			
	t_m		$\%A_{corr}$		t_m		$\%A_{corr}$	
	M (min)	RSD (%)	M (min)	RSD (%)	M (min)	RSD (%)	M (min)	RSD (%)
1'	7,48	0,9	4,99	3,3	7,34	2,5	4,42	10,5
2'	7,76	0,9	30,98	1,5	7,59	2,7	32,85	4,7
3'	8,01	0,9	17,84	2,1	7,83	2,7	18,13	1,9
4'	8,33	0,9	16,96	1,8	8,13	2,8	16,49	5,2
5'	8,56	1,0	13,55	0,5	8,36	2,9	13,57	0,6
6'	8,84	1,0	9,34	4,6	8,62	3,0	8,59	6,1
7'	9,23	1,1	6,34	5,6	9,01	3,0	5,96	8,4

3.4. CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

A lo largo de este capítulo se han presentado métodos de derivatización fluorescente aplicados al PSA y a otras dos proteínas de interés clínico, HSA y AGP, para su análisis por CE-LIF. Los diferentes reactivos fluorescentes y distintos procedimientos ensayados ponen de manifiesto los dos principales retos que plantea la derivatización fluorescente de proteínas, en especial en el caso de isoformas de glicoproteínas: 1) evitar el ensanchamiento o desdoblamiento de los picos electroforéticos debidos a la generación de múltiples productos fluorescentes de reacción o la degradación de la estructura durante el proceso de derivatización, y 2) la aplicación a muestras muy diluidas por la dificultad que entraña la reacción a bajas concentraciones de proteína.

La derivatización no-covalente con NanoOrange permitió la detección fluorescente de una disolución diluida de HSA, sin embargo, la unión no-covalente de NanoOrange al PSA no permitió la detección de PSA a concentraciones del orden de 15 $\mu\text{g/ml}$. Por tanto, este método es inadecuado para la detección de esta glicoproteína en algunas matrices biológicas de interés, como son la orina y la sangre. Este estudio revela una vez más otro inconveniente de estos procedimientos de derivatización no-covalente, la variabilidad que puede existir entre distintas proteínas en cuanto a la efectividad de su derivatización fluorescente con un determinado colorante, lo que hace muy difícil establecer la derivatización no-covalente como un método universal de derivatización.

La derivatización covalente se ha empleado en este trabajo para la derivatización de proteínas a través de grupos tiol liberados de los puentes disulfuro de la glicoproteína. El método se ha empleado satisfactoriamente con dos colorantes diferentes, 5-IAF y BODIPY-IA, para el marcado fluorescente de AGP, una glicoproteína involucrada en numerosos procesos biológicos y que ha sido considerada en varias ocasiones como potencial biomarcador de algunos tipos de cáncer y enfermedades vasculares. La derivatización fluorescente de AGP con 5-IAF y BODIPY-IA condujo a la separación de 11 y 8 isoformas de la glicoproteína, respectivamente, con mayor resolución en el caso de 5-IAF y unos LOD instrumentales respectivos de 80 y 16 ng/ml, cuando la glicoproteína se derivatizó a una concentración del orden de mg/ml. El procedimiento se aplicó también satisfactoriamente a la derivatización con 5-IAF de AGP procedente de dos muestras biológicas purificadas por IAC, demostrando su posible aplicación al estudio de isoformas de AGP derivatizada como biomarcador de enfermedades. No ocurrió lo mismo cuando los métodos con ambos colorantes se aplicaron al PSA, para el que, aunque la reacción de derivatización tiene lugar, conduce a la detección de un único pico electroforético ensanchado y sin separación de isoformas. Los resultados mostrados parecen indicar que la pérdida de resolución está originada por la

reducción de los cinco puentes disulfuro del PSA, necesaria para la reacción posterior con los derivados de iodoacetamida. Estos cambios irreversibles en la estructura tridimensional del PSA impedirían la separación de sus isoformas tras la derivatización.

Por último, la derivatización covalente se realizó también a través de grupos amino para el marcado fluorescente del PSA con Chromeo P503. Este colorante no modifica el pI de la proteína, lo que permitió la detección por CE-LIF de 7 isoformas del PSA derivatizado pre-capilar con P503, con buena resolución y buena repetibilidad. Sin embargo, la sensibilidad en CE-LIF obtenida para el PSA marcado fluorescentemente por un método pre-capilar no fue notablemente mejor que la obtenida para el análisis por CE-UV de esta misma glicoproteína sin derivatizar. Una vez más, se demuestra la enorme variabilidad que existe entre proteínas para los métodos de derivatización fluorescente, ya que en la bibliografía pueden encontrarse resultados de marcado fluorescente con P503 para disoluciones de proteínas a un nivel de concentración de hasta ng/ml. Con este reactivo se ha desarrollado también un método de derivatización en-capilar, conocido por proporcionar para otras proteínas y con otro agente derivatizante límites de detección del orden de pg/ml. Sin embargo, aunque la derivatización hizo posible la detección fluorescente de al menos 7 isoformas de PSA, el método no proporcionó un rendimiento de reacción suficiente para aumentar la sensibilidad de detección de PSA. Se ha demostrado, no obstante, que el procedimiento de derivatización en-capilar supone un notable ahorro de tiempo. En efecto, se ha obtenido una sensibilidad de aproximadamente el doble para PSA, en un tiempo de reacción de 45 segundos por derivatización en-capilar que en 4 horas pre-capilar.

Finalmente, se puede concluir que es necesario seguir investigando métodos para tratar de disminuir los LOD en el análisis por CE-LIF de isoformas de glicoproteínas con un potencial valor clínico en la detección, diagnóstico y pronóstico de enfermedades tan importantes como el cáncer de próstata, una vez que

se ha salvado en este trabajo, para los LOD obtenidos, el importante obstáculo que supone la resolución por CE de isoformas de glicoproteínas tras su derivatización fluorescente.

3.5. REFERENCIAS

- [1] Drake, R. R., White, K. Y., Fuller, T. W., Igwe, E., Clements, M. A., Nyalwidhe, J. O., Given, R. W., Lance, R. S., Semmes, O. J., *J. Proteomics* 2009, *72*, 907-917.
- [2] Rifai, N., Gillette, M. A., Carr, S. A., *Nat. Biotechnol.* 2006, *24*, 971-983.
- [3] Anderson, N. L., Anderson, N. G., *Mol. Cell Proteomics* 2002, *1*, 845-867.
- [4] De Angelis, G., Rittenhouse, H. G., Mikolajczyk, S. D., Blair Shamel, L., Semjonow, A., *Rev. Urol.* 2007, *9*, 113-123.
- [5] Jung, K., Hoesel, W., Relche, J., Deger, S., Kramer, J., Loening, S. A., Lein, M., Stephan, C., *Urology* 2007, *69*, 320-325.
- [6] Peracaula, R., Barrabes, S., Sarrats, A., Rudd, P. M., de Llorens, R., *Dis. Markers* 2008, *25*, 207-218.
- [7] Sokoll, L. J., Wang, Y., Feng, Z., Kagan, J., Partin, A. W., Sanda, M. G., Thompson, I. M., Chan, D. W., *J. Urol.* 2008, *180*, 539-543.
- [8] Meany, D. L., Zhang, Z., Sokoll, L. J., Zhang, H., Chan, D. W., *J. Proteome Res.* 2009, *8*, 613-619.
- [9] Jansen, F. H., Roobol, M., Jenster, G., Schroder, F. H., Bangma, C. H., *Eur. Urol.* 2009, *55*, 563-574.
- [10] Sarrats, A., Comet, J., Tabares, G., Ramirez, M., Aleixandre, R. N., de Llorens, R., Peracaula, R., *Prostate* 2010, *70*, 1-9.
- [11] Jankovic, M. M., Kosanovic, M. M., *Clin. Biochem.* 2005, *38*, 58-65.
- [12] Lee, I. H., Pinto, D., Arriaga, E. A., Zhang, Z. R., Dovichi, N. J., *Anal. Chem.* 1998, *70*, 4546-4548.
- [13] Hu, S., Zhang, L., Cook, L. M., Dovichi, N. J., *Electrophoresis* 2001, *22*, 3677-3682.
- [14] Swaile, D. F., Sepaniak, M. J., *J. Liq. Chromatogr.* 1991, *14*, 869-893.
- [15] Chan, K. C., Muschik, G. M., Issaq, H. J., *Electrophoresis* 2000, *21*, 2062-2066.

- [16] Lacroix, M., Poinso, V., Fournier, C., Couderc, F., *Electrophoresis* 2005, **26**, 2608-2621.
- [17] Benito, I., Marina, M. L., Saz, J. M., Diez-Masa, J. C., *J. Chromatogr. A* 1999, **841**, 105-114.
- [18] McCorquodale, E. M., Colyer, C. L., *Electrophoresis* 2001, **22**, 2403-2408.
- [19] Yan, W. Y., Colyer, C. L., *J. Sep. Sci.* 2005, **28**, 1409-1415.
- [20] Yan, W. Y., Sloat, A. L., Yagi, S., Nakazumi, H., Colyer, C. L., *Electrophoresis* 2006, **27**, 1347-1354.
- [21] Liu, Y. J., Foote, R. S., Jacobson, S. C., Ramsey, R. S., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 2000, **72**, 4608-4613.
- [22] Harvey, M. D., Bablekis, V., Banks, P. R., Skinner, C. D., *J. Chromatogr. B* 2001, **754**, 345-356.
- [23] Feng, H. T., Li, S. F. Y., Chia, P. S., Loke, W. K., *J. Liq. Chromatogr.* 2006, **29**, 1447-1455.
- [24] Chiu, T. C., Lin, Y. W., Huang, C. C., Chrambach, A., Chang, H. T., *Electrophoresis* 2003, **24**, 1730-1736.
- [25] Jin, L. J., Giordano, B. C., Landers, J. P., *Anal. Chem.* 2001, **73**, 4994-4999.
- [26] Sze, N. S. K., Huang, T. M., Pawliszyn, J., *J. Sep. Sci.* 2002, **25**, 1119-1122.
- [27] Rudd, P. M., Scragg, I. G., Coghill, E., Dwek, R. A., *Glycoconj. J.* 1992, **9**, 86-91.
- [28] Ongay, S., Puerta, A., Diez-Masa, J. C., Bergquist, J., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2009, **30**, 315-324.
- [29] Pinto, D. M., Arriaga, E. A., Craig, D., Angelova, J., Sharma, N., Ahmadzadeh, H., Dovichi, N. J., Boulet, C. A., *Anal. Chem.* 1997, **69**, 3015-3021.
- [30] Hart, J. J., Welch, R. M., Norvell, W. A., Kochian, L. V., *Electrophoresis* 2002, **23**, 81-87.
- [31] Zinellu, A., Carru, C., Galistu, F., Usai, M. F., Pes, G. M., Baggio, G., Federici, G., Deiana, L., *Electrophoresis* 2003, **24**, 2796-2804.
- [32] Bock, P. E., *Biochemistry* 1988, **27**, 6633-6639.

- [33] Bayle, C., Issac, C., Salvayre, R., Couderc, F., Causse, E., *J. Chromatogr. A* 2002, **979**, 255-260.
- [34] Carru, C., Deiana, L., Sotgia, S., Pes, G. M., Zinellu, A., *Electrophoresis* 2004, **25**, 882-889.
- [35] Chumsae, C., Gaza-Bulsecu, G., Liu, H. C., *Anal. Chem.* 2009, **81**, 6449-6457.
- [36] Terada, N., Shimozawa, T., Ishiwata, S., Funatsu, T., *Biophys. J.* 2007, **92**, 2162-2171.
- [37] Hochgrafe, F., Wolf, C., Fuchs, S., Liebeke, M., Lalk, M., Engelmann, S., Hecker, M., *J. Bacteriol.* 2008, **190**, 4997-5008.
- [38] Craig, D. B., Wetzl, B. K., Duerkop, A., Wolfbeis, O. S., *Electrophoresis* 2005, **26**, 2208-2213.
- [39] Ramsay, L. M., Dickerson, J. A., Dovichi, N. J., *Electrophoresis* 2009, **30**, 297-302.
- [40] Ramsay, L. M., Dickerson, J. A., Dada, O., Dovichi, N. J., *Anal. Chem.* 2009, **81**, 1741-1746.
- [41] Pinto, D. M., Arriaga, E. A., Sia, S., Li, Z., Dovichi, N. J., *Electrophoresis* 1995, **16**, 534-540.
- [42] Pelaez-Lorenzo, C., Diez-Masa, J. C., Vasallo, I., de Frutos, M., *Anal. Chim. Acta* 2009, **649**, 202-210.
- [43] Ongay, S., Neusuess, C., Vaas, S., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2010, **31**, 1796-1804.
- [44] Puerta, A., Diez-Masa, J. C., Martin-Alvarez, P. J., Martin-Ventura, J. L., Barbas, C., Tuñón, J., Egido, J., de Frutos, M., *Analyst* 2011, **136**, 816-822.
- [45] Puerta, A., Martin-Alvarez, P. J., Ongay, S., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., en: Phillips, T., Kalish, H. (Eds.), *Clinical Applications of Capillary Electrophoresis. Methods in Molecular Biology Series*, Vol. 919, Springer Protocols, Humana Press 2013, pp. 215-230.
- [46] Liu, Z., Pawliszyn, J., *Anal. Biochem.* 2005, **336**, 94-101.

- [47] Lacunza, I., Sanz, J., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M., *Electrophoresis* 2006, *27*, 4205-4214.
- [48] Giordano, B. C., Horsman, K. M., Burgi, D. S., Ferrance, J. P., Landers, J. P., *Electrophoresis* 2006, *27*, 1355-1362.
- [49] Burns, J. A., Butler, J. C., Moran, J., Whitesides, G. M., *J. Org. Chem.* 1991, *56*, 2648-2650.
- [50] Shafer, D. E., Inman, J. K., Lees, A., *Anal. Biochem.* 2000, *282*, 161-164.
- [51] Ongay, S., Neusüß, C., *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, *398*, 845-855.
- [52] Kibblewhite, J., Drummond, C. J., Grieser, F., Thistlethwaite, P. J., *J. Phys. Chem.* 1989, *93*, 7464-7473.
- [53] Banks, P. R., *Trends Anal. Chem.* 1998, *17*, 612-622.
- [54] Weber, W., Buck, F., Meyer, A., Hilz, H., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2009, *379*, 1101-1106.
- [55] Meier, R. J., Steiner, M. S., Duerkop, A., Wolfbeis, O. S., *Anal. Chem.* 2008, *80*, 6274-6279.
- [56] Yu, M., Wang, H. Y., Woolley, A. T., *Electrophoresis* 2009, *30*, 4230-4236.
- [57] Harmon, B. J., Patterson, D. H., Regnier, F. E., *Anal. Chem.* 1993, *65*, 2655-2662.

Conclusiones Generales

1. Es posible separar isoformas del antígeno específico de próstata (PSA) por electroforesis capilar con detección ultravioleta empleando diferentes métodos compatibles con la derivatización fluorescente de la proteína a través de sus grupos amino. El recubrimiento dinámico del capilar con bromuro de decametonio proporciona, en un tiempo de separación razonable (20 min), con elevada precisión, mayores resoluciones de las 8 isoformas separadas de PSA que las obtenidas con los recubrimientos de morfolina o UltraTrol LN.
2. La cromatografía de inmunoadfinidad, empleando columnas de formato HPLC fabricadas en el laboratorio con anti-PSA unido a un relleno de sílice con grupos funcionales epóxido, permite la purificación de forma rápida (unos 20 minutos la etapa de inmunoadfinidad y unas 3 horas el proceso total), sencilla y reproducible de PSA a partir de plasma seminal. El empleo de ácido propiónico 1 M como eluyente proporciona porcentajes de recuperación superiores al 40% del PSA contenido en la muestra, que junto con el grado de pureza logrado permiten el posterior análisis de sus isoformas por electroforesis capilar a partir de tan solo 5 µl de plasma seminal.
3. La reacción covalente a través de los grupos amino de PSA con el derivado comercial de pirilio Chromeo P503 permite su derivatización y la separación de 7 de sus isoformas por CE-LIF. La derivatización se puede llevar a cabo tanto fuera del capilar como en el propio capilar de electroforesis. La derivatización en-capilar en tan solo 45 s proporciona una sensibilidad ligeramente superior a la obtenida mediante la derivatización fuera del capilar durante 4 horas.

